

【公報種別】特許公報の訂正

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】令和5年10月20日(2023.10.20)

【特許番号】特許第7353294号(P7353294)

【登録日】令和5年9月21日(2023.9.21)

【特許公報発行日】令和5年9月29日(2023.9.29)

【年通号数】登録公報(特許)2023-184

【出願番号】特願2020-550103(P2020-550103)

【訂正要旨】特許権者の住所の誤載により、下記のとおり全文を訂正する。

10

【国際特許分類】

C 1 2 N 7/01(2006.01)

C 0 7 K 7/08(2006.01)

C 0 7 K 7/06(2006.01)

A 6 1 K 35/761(2015.01)

A 6 1 P 35/00(2006.01)

A 6 1 P 35/02(2006.01)

A 6 1 K 9/08(2006.01)

A 6 1 P 43/00(2006.01)

A 6 1 K 47/69(2017.01)

C 1 2 N 15/861(2006.01)

20

【F I】

C 1 2 N 7/01 Z N A

C 0 7 K 7/08

C 0 7 K 7/06

A 6 1 K 35/761

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02

A 6 1 K 9/08

A 6 1 P 43/00 1 2 1

A 6 1 K 47/69

C 1 2 N 15/861 Z

30

【記】別紙のとおり

40

50

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7353294号  
(P7353294)

(45)発行日 令和5年9月29日(2023.9.29)

(24)登録日 令和5年9月21日(2023.9.21)

(51)国際特許分類	F I		
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	Z N A	
C 0 7 K 7/08 (2006.01)	C 0 7 K 7/08		
C 0 7 K 7/06 (2006.01)	C 0 7 K 7/06		
A 6 1 K 35/761 (2015.01)	A 6 1 K 35/761		
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00		

請求項の数 19 (全38頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2020-550103(P2020-550103)	(73)特許権者	517199709
(86)(22)出願日	平成31年3月19日(2019.3.19)		パロ セラピューティクス オイ
(65)公表番号	特表2021-518124(P2021-518124 A)		VALO THERAPEUTICS OY
(43)公表日	令和3年8月2日(2021.8.2)		フィンランド, 00790 ヘルシンキ
(86)国際出願番号	PCT/EP2019/056770	(74)代理人	100114188
(87)国際公開番号	WO2019/179979		弁理士 小野 誠
(87)国際公開日	令和1年9月26日(2019.9.26)	(74)代理人	100119253
審査請求日	令和4年2月9日(2022.2.9)		弁理士 金山 賢教
(31)優先権主張番号	1804468.5	(74)代理人	100124855
(32)優先日	平成30年3月21日(2018.3.21)		弁理士 坪倉 道明
(33)優先権主張国・地域又は機関	英国(GB)	(74)代理人	100129713
(31)優先権主張番号	1814866.8		弁理士 重森 一輝
(32)優先日	平成30年9月13日(2018.9.13)	(74)代理人	100137213
	最終頁に続く		弁理士 安藤 健司
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 癌治療

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

修飾アデノウイルスであって、

アデノウイルスベクターによって遺伝的にコードされることなく、ウイルスのカプシド上に共有結合または非共有結合により接続している以下に示すポリペプチド：

- i) V F G I E L M E V D P I G H L Y I F A T [配列番号1]；
- ii) Y L A M P F A T P M E A E L A R R S L A [配列番号2]；
- iii) それらと少なくとも90%同一であるポリペプチド

の少なくとも1つを含み、

前記アデノウイルスが、共刺激分子をコードする少なくとも1つの導入遺伝子の挿入を含むようにさらに改変されており；前記少なくとも1つの導入遺伝子が、C D 4 0 Lおよび/またはO X 4 0 Lをコードするものである、修飾アデノウイルス。

【請求項2】

前記ポリペプチドが、少なくとも3、4、5、6、7、8、または9個のリジンを用いて伸長されたポリリジンである、請求項1に記載の修飾アデノウイルス。

【請求項3】

前記リジンが前記ポリペプチドのアミノ末端に結合している、請求項2に記載の修飾アデノウイルス。

【請求項4】

前記ポリペプチドが、

KKKKKK (KKK) - VFGIELMEVDPIGHL YIFAT [配列番号 7] ;

および/または

KKKKKK (KKK) - YLAMPFATPMEAE LARRSLA [配列番号 8]

;あるいは、

KKKKKK - VFGIELMEVDPIGHL YIFAT [配列番号 4] ;および/また

または

KKKKKK - YLAMPFATPMEAE LARRSLA [配列番号 : 5]

である、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の修飾アデノウイルス。

【請求項 5】

前記アデノウイルスが、ヒトアデノウイルスである、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 に記載の修飾アデノウイルス。 10

【請求項 6】

前記アデノウイルスが、E 1 および/または E 3 および/または E 4 および/または L 3 遺伝子における修飾を含み;前記修飾が、腫瘍特異的プロモーターの挿入、少なくとも 1 つの遺伝子欠失および少なくとも 1 つの導入遺伝子の挿入よりなる群から選択される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 に記載の修飾アデノウイルス。

【請求項 7】

前記アデノウイルスが、血清型 5 である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 に記載の修飾アデノウイルス。

【請求項 8】

前記アデノウイルスが、Ad 5 / 3 キメラ置換を含むようにさらに修飾され、血清型 5 アデノウイルス線維ノブ領域が血清型 3 アデノウイルスノブ領域に置換されている、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 に記載の修飾アデノウイルス。 20

【請求項 9】

前記アデノウイルスが、E 1 A 遺伝子欠失を含むようにさらに改変され、アミノ酸 1 2 2 ~ 1 2 9 をコードするヌクレオチドの少なくとも 1 つが欠失している、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 に記載の修飾アデノウイルス。

【請求項 10】

前記アデノウイルスが、1 4 . 7 k 遺伝子の部分的または完全な欠失を含むようにさらに改変されている、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 に記載の修飾アデノウイルス。 30

【請求項 11】

前記アデノウイルスが少なくとも 2 つの導入遺伝子を含み、前記導入遺伝子の一方が先天性免疫系を活性化する共刺激分子をコードし、他方が適応免疫系を活性化する共刺激分子をコードする、請求項 1 に記載の修飾アデノウイルス。

【請求項 12】

前記導入遺伝子がヒトである、請求項 1 に記載の修飾アデノウイルス。

【請求項 13】

前記 OX 4 0 L が、E 3 B 領域に位置し、遺伝子 1 4 . 7 K の欠失を置換する、請求項 1 に記載の修飾アデノウイルス。

【請求項 14】

前記 CD 4 0 L 分子が、2 A プロセッシング部位を用いて OX 4 0 L のすぐ下流に挿入される、請求項 1 に記載の修飾アデノウイルス。 40

【請求項 15】

ペプチド対ウイルス比が、3 E + 9 ウイルス粒子当たり 1 ~ 5  $\mu$  g の範囲である、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか 1 に記載の修飾アデノウイルス。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 1 5 のいずれか 1 に記載の少なくとも 1 つの修飾アデノウイルスと、適切なキャリアとを含む、医薬組成物。

【請求項 17】

前記組成物が、腫瘍内、筋肉内、動脈内、静脈内、胸膜内、小胞内、皮内、腔内もしくは 50

は腹腔内注射、または経口投与のために製剤化されている、請求項 16 に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

癌の治療に使用するための、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 に記載の少なくとも 1 つの修飾アデノウイルス；または、請求項 16 ~ 17 のいずれか 1 に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

癌を治療するための薬剤の製造における、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 に記載の少なくとも 1 つの修飾アデノウイルスの使用。

10

20

30

40

50

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、修飾された腫瘍溶解性アデノウイルス；それを含む医薬組成物；およびそれを用いて癌を治療する方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

癌治療における腫瘍溶解性ウイルスの役割の認識は、癌を標的として攻撃するための免疫療法や患者自身の免疫系の刺激が普及することにつれて、過去10年の間に劇的に変化してきた。今世紀初頭、腫瘍溶解性ウイルスは腫瘍溶解を介して腫瘍細胞を溶解する固有の能力を介してのみ作用し、癌治療において活性物質として認識された。最近、癌ワクチンとしての使用に関心を集めており、免疫系を活性化するための腫瘍崩壊時に癌細胞から腫瘍抗原を放出するそれらの能力は、癌に対する最終的な免疫療法をデザインする際の重要な特徴として認識されている。

10

## 【0003】

アデノウイルスは、感染症に対する様々なワクチンアプローチにおいてベクターとしてしばしば使用される免疫原性の高いウイルスである。重要なことに、これらは、免疫応答を刺激し、増幅するという両方の並外れた能力を有する。さらに、腫瘍内に腫瘍崩壊性アデノウイルスが存在し、それが引き起こす免疫原性細胞死は、IFNのようなTH1型免疫モジュレーターの発現を引き起こすことによって、臨床的に重要な抗腫瘍免疫が生じるためのより感受性の高い状態に向かって、敵対的な腫瘍微小環境を形作る可能性が高い。しかしながら、腫瘍崩壊性アデノウイルスの免疫原性は両刃の剣である。抗ウイルス免疫はしばしば非常に圧倒的であり、腫瘍によって発現される自己抗原に対して誘発されるはるかに弱い免疫応答を無効にする。

20

## 【0004】

ペプチドワクチンは癌の免疫療法において魅力的な概念であったが、従来のペプチドワクチンアプローチの臨床的有効性は一般に乏しいと認識されている。癌ワクチンは、抗腫瘍免疫応答を増大させるために必要な炎症シグナルを提供すべきアジュバントと組み合わせて癌抗原を送達する。しかしながら、中枢および末梢寛容、ならびに腫瘍進行時の免疫編集のプロセスは、典型的にはペプチドワクチンの候補ペプチドを選択する際にインビトロで見られるT細胞反応性の損失を生じる。現在のワクチンアジュバントは、たとえ腫瘍が選択された抗原を発現していても、免疫抑制された腫瘍における耐性を破壊するほど単に強力ではない。さらに、多くのペプチドワクチンアプローチは、MHCクラスI結合CD8+T細胞エピトープの正確で最小の配列に一致する短いペプチドに基づいている。前臨床腫瘍モデルにおける有望な結果にもかかわらず、短いペプチドは患者において全身性末梢性免疫寛容を引き起こすことが示されており、これは重要な補助刺激シグナルを欠く非専門的APCまたは非成熟DCによるペプチドの提示に起因すると仮定されている。

30

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明は、上記の2つのワクチンアプローチを、両方のうちの最良のものを利用する方法で組み合わせるものである。腫瘍溶解性アデノウイルスと癌抗原を組み合わせた物理的実体は、a) 圧倒的に強いウイルス特異的標的および免疫細胞に対する十分な腫瘍特異的標的の欠如、b) 弱いアジュバントの問題、およびc) 短いペプチドワクチンによって誘発される中枢性寛容の問題の問題を解決する。

40

## 【0006】

したがって、本発明は、腫瘍溶解性アデノウイルスとペプチドワクチンという2つの臨床的に証明された癌免疫療法アプローチを組み合わせる革新的かつ独特な方法である、ペプチドで被覆された条件的複製アデノウイルス (PeptiCRAd: Peptide-coated Conditionally Replicating Adenovirus)

50

s)に関する。PeptiCRAdは、腫瘍特異的ペプチドの活性キャリアとして免疫原性ウイルスを使用し、免疫系に癌細胞を特異的に標的化し、殺傷するよう指示する。さらに、腫瘍抗原を遺伝的にコードする腫瘍溶解性ウイルスワクチンとは対照的に、アデノウイルスを免疫原性ペプチドでコーティングするPeptiCRAd技術は、すべての癌に対して高度に適応可能であり；同じキャリアウイルスがすべての癌を処置するために使用され得、そしてウイルスを異なるポリリジン伸長ペプチドでコーティングするだけで適応が起こり得る。このユニークな技術はアデノウイルスの顕著な免疫原性を利用し、同時にCD8+ T細胞応答を腫瘍組織に向ける。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明の第1の態様によれば、修飾アデノウイルスまたはベクターであって、前記アデノウイルスベクターによって遺伝的にコードされることなく、ウイルスのカプシド上に共有結合または非共有結合により接続している以下に示すポリペプチド：

- i) V F G I E L M E V D P I G H L Y I F A T [配列番号1]；
  - ii) Y L A M P F A T P M E A E L A R R S L A [配列番号2]；
  - iii) R G P E S R L L E F Y L A M P F A T P M [配列番号3]；または
  - iv) それらと少なくとも60%同一であるポリペプチド
- の少なくとも1つを含む、修飾アデノウイルスまたはベクターが提供される。

【図面の簡単な説明】

【0008】

【図1】図1は、本発明による修飾アデノウイルスの概略図を示す。

【図2】図2は、選択された2つのペプチドを示す。

【図3】図3は、図2のペプチドのN末端におけるポリリジン尾部が癌患者において既知の免疫活性化能力を有する臨床的に使用された未修飾ペプチドと比較した場合に、ペプチドの免疫学的特性を変化させないことを示す。

【図4】図4は、水中のNY-ESO-1ペプチド-ウイルス複合体および異なるペプチド濃度を有する生理的塩の両方の平均流体力学的直径を示す。

【図5】図5は、NYESO-1およびMAGE-A3-ペプチド被覆修飾ウイルス(OX40L-およびCD40L-発現ウイルス(PeptiCRAd-1))を含む5/3カプシド、またはNYESO-1およびMAGE-A3-ペプチド被覆(VALO-C1)またはペプチドのみを含まない同一ウイルスを含む、本発明によるNYESO-1およびMAGE-A3-ペプチド被覆修飾ウイルスで処理した場合の、処理および対側、未処理の腫瘍におけるT細胞の頻度を示す。

【図6】図6は、ペプチドコーティング(VALO-C1)またはペプチド単独を用いずにPeptiCRAd-1または同じウイルスで処理した場合の、処理した腫瘍および対側の未処理腫瘍におけるすべての免疫細胞(CD45+細胞)の頻度を示す。

【図7】図7は、PeptiCRAdおよびVALO-C1の処理により、処理された腫瘍におけるすべてのTILからの制御性T細胞の割合を減少させることを示す。

【図8】図8は、ペプチドコーティング(VALO-C1)またはペプチド単独なしでPeptiCRAd-1または同じウイルスで処理した場合の血液腫瘍中のNY-ESO-1(A)およびMAGE-A3特異的(B)CD8+ T細胞の割合を示す。

【図9】図9は、ペプチドコーティング(VALO-C1)またはペプチド単独を用いずにPeptiCRAd-1または同じウイルスで処理した場合、または対側の未処理腫瘍におけるNY-ESO-1またはMAGE-A3特異的CD8+ T細胞の割合を示す。

【図10】図10は、NY-ESO-1およびMAGE-A3タンパク質でコーティングされたPeptiCRAdが大きな、十分に確立された腫瘍に対して治療を開始しても、ヒト化マウスメラノーマモデルにおいて腫瘍増殖を停止することができることを示す。

【図11】図11は、模擬処置動物と比較して、OX40L-PeptiCRAdが末梢血中のMAGE-A3特異的CD8+ T細胞数を増加させたことを示す。

【図12】図12A)は、滅菌水中に希釈され、流動緩衝液として滅菌水を使用するAP

10

20

30

40

50

T E S センサ上での固定化した A d V 調製中における 3 つの別々の S P R 応答を示す。図 1 2 B ) は、3 つの異なるペプチドコーティングの場合の S P R 応答である。

【図 1 3】図 1 3 は、A 1 9 5 緩衝液中で希釈されたペプチドコーティング P E P 1 4 5 5、P E P 1 4 5 6 および P E P 1 5 0 8 試料の濃度を増加により固定化 A d V 粒子と相互作用させた場合の S P R 応答である。

【発明を実施するための形態】

【0009】

本発明の好ましい実施形態において、前記アデノウイルスは、標的細胞において複製し、溶解活性を有することができる。

【0010】

さらにより好ましくは、i v ) の部分の前記ポリペプチドは、i ) または i i ) または i i i ) の部分のポリペプチドと 6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、8 9、9 0、9 1、9 2、9 3、9 4、9 5、9 6、9 7、9 8、または 9 9 % 同一である。

【0011】

有利には、前記ポリペプチドが、患者におけるペプチド特異的免疫応答を刺激することができ、さらにより有利には、前記ポリペプチドが前記アデノウイルスベクターによって遺伝的にコードされていないが、共有結合的または非共有結合的にカプシドに結合されているので、この結合は迅速かつ効率的に、すなわち宿主細胞におけるウイルス複製が起こるのを待つ必要なく、実行することができる。典型的には少なくとも 1 つまたは 2 つまたは 3 つのポリペプチドの結合を容易にするために、前記ポリペプチドは少なくとも 4 つ、理想的には 5、6、7、8 または 9 つのリジンを使用してポリリジン伸長される。最も典型的には、6 または 9 個のリジンが使用され、最も好ましくはポリペプチドのアミノ末端に結合される。

【0012】

従って、アデノウイルスへの付着のためのペプチドは以下である：

K K K K K K ( K K K ) - V F G I E L M E V D P I G H L Y I F A T [ 配列番号 7 ] ；  
および / または

K K K K K K ( K K K ) - Y L A M P F A T P M E A E L A R R S L A [ 配列番号 8 ]

；および / または

K K K K K K ( K K K ) - R G P E S R L L E F Y L A M P F A T P M [ 配列番号 9 ]

；あるいは、

K K K K K K - V F G I E L M E V D P I G H L Y I F A T [ 配列番号 4 ] ；および / または

K K K K K K - Y L A M P F A T P M E A E L A R R S L A [ 配列番号 : 5 ] ；および / または

K K K K K K - R G P E S R L L E F Y L A M P F A T P M [ 配列番号 : 6 ]

である。

【0013】

本発明のさらなる好ましい実施形態において、前記アデノウイルスは任意の型および種のアデノウイルスであり得、例えば、ヒトアデノウイルスに限定されないが、最も典型的にはヒトアデノウイルスである。最も好ましいのは、アデノウイルスが腫瘍に対する抗ウイルス免疫応答を転換しながら、癌細胞を複製し、殺傷することが可能であり、したがって、改変されたアデノウイルスまたはベクターは自律増殖可能 ( r e p l i c a t i o n c o m p e t e n t ) であり、腫瘍溶解性である。

【0014】

本発明において使用されるアデノウイルスまたはベクターは、複製に関して腫瘍特異的であることができ、例えば、アデノウイルスベクターは、腫瘍特異的プロモーターの挿入、遺伝子欠失および導入遺伝子の挿入のような、E 1、E 3、E 4 および / または L 3 遺

10

20

30

40

50

伝子における修飾を含み得る。

【0015】

理想的には、アデノウイルスまたはベクターは、腫瘍溶解性、すなわち、腫瘍対正常細胞における選択的複製によって癌細胞を感染させ、殺傷することができる。

【0016】

アデノウイルスまたはベクターのバックボーンは、任意の血清型であり得る。本発明の一実施形態では、アデノウイルスまたはベクター骨格の血清型が血清型3または5から選択される。本明細書中で使用される場合、「アデノウイルス血清型5 (Ad5) 核酸バックボーン」はAd5のゲノムをいい、「アデノウイルス血清型3 (Ad3) 核酸バックボーン」は、Ad3のゲノムを意味する。

10

【0017】

さらに、ウイルスまたはベクターは、キメラであることができ、例えば、Ad5/3、Ad3/5またはAd5/35ベクターであってもよい。一例として、「Ad5/3ベクター」は、Ad5ベクターおよびAd3ベクターの両方の一部を有するキメラウイルスまたはベクターを意味する。

【0018】

アデノウイルスまたはベクターの「カプシド」とは、当該ウイルスのタンパク質シェルを意味する。カプシドは、プロトマーとよばれるタンパク質からなるいくつかのオリゴマー構造サブユニットからなる。

【0019】

最も好ましくは、前記アデノウイルスまたはベクターは、T細胞応答のプライミングおよびブーストに最適であるように選択される血清型5である。それは腫瘍を殺傷するのに必要なCD8+T細胞を誘発し；腫瘍溶解性ウイルスに対する既存の免疫が腫瘍内治療の有効性を増強し、良好な臨床的安全性記録を有する。

20

【0020】

本発明のさらなる好ましい実施形態において、前記アデノウイルスまたはベクターは、以下の特徴のいずれか1つ以上（それらのいずれかおよびすべての組み合わせを含む）を含むようにさらに改変される。

【0021】

Ad5/3キメラ置換：すなわち、血清型5アデノウイルス繊維ノブ領域を血清型3アデノウイルスノブ領域のものと置換したもの。これにより、ウイルスまたはベクターはAd5天然受容体コクサッキー・アデノウイルス受容体(CAR)を回避し、代わりにAd3天然受容体デスマグレイン2(DSG2)を内在化のために使用することが可能になる。DSG2は癌細胞に豊富に存在する。

30

【0022】

アデノウイルス感染は、ウイルス表面上の特殊なタンパク質、すなわちアデノウイルス繊維タンパク質、特にアデノウイルス繊維タンパク質の球状カルボキシ末端ドメイン（カルボキシ末端ノブドメインと呼ばれる）の手段による宿主細胞受容体の認識で始まる。従って、本明細書中において、アデノウイルス繊維タンパク質のノブへは、アデノウイルス繊維タンパク質の球状カルボキシ末端ドメインを意味する。

40

【0023】

アミノ酸122~129(LTCH E A C F)をコードするヌクレオチドの欠失であるE1A遺伝子欠失：当該欠失は、ウイルスまたはベクターE1A蛋白質が網膜芽細胞腫(Rb)分子に結合できず、ウイルス遺伝子転写のためにRbから転写因子E2Fを放出することができないための安全性尺度である。したがって、アデノウイルスまたはベクターは、宿主細胞中の遊離E2Fの存在に依存し、遊離E2Fが常に利用可能な分裂正常細胞または癌細胞のいずれかにおいてそのゲノムを複製することができる。したがって、修飾は非分裂細胞を相対的に保護し、分裂細胞または癌細胞に対して標的化される。

【0024】

この遺伝子産物の免疫抑制的役割を考えると、E3遺伝子の部分的欠失は免疫原性を高

50

める。理想的には、14.7K遺伝子は一部または全部が削除される。

【0025】

好ましい実施形態において、前記修飾アデノウイルスまたはベクターは、共刺激分子をコードする少なくとも1つの導入遺伝子、および理想的には2つの導入遺伝子の挿入を含み、ここで、前記遺伝子の一方は先天性免疫系の活性化をもたらす、他方は適応免疫系の活性化をもたらす。好ましい導入遺伝子には、CD8+T細胞応答を駆動するAPCの使用によって自然免疫系を活性化するためのCD40L、およびクローン増殖、CD8+T細胞の生存および記憶T細胞の大きなプールの形成を増加させることによって適応免疫系を活性化するためのOX40Lが含まれる。

【0026】

多数の導入遺伝子が、アデノウイルスまたはベクターの異なる位置に配置され得る。1つの導入遺伝子は例えば、E3プロモーターの下または外因性プロモーターの下のいずれかで、部分的または全体的に欠失したE3領域中に、またはE1プロモーターの下または外因性プロモーターの下のいずれかで、部分的または全体的に欠失したE1領域中に、またはL3プロモーターの下または外因性プロモーターの下の部分的または全体的に欠失したL3領域中に配置され得る。

【0027】

最も好ましくは、OX40L（理想的にはヒトOX40L）はE3B領域に位置し、遺伝子14.7K欠失を置換する。

【0028】

また、最も好ましくはCD40L、理想的にはヒトCD40Lはウイルスの後期領域、特に後期領域3（L3）、理想的には23K遺伝子から下流に挿入される。

【0029】

好ましい実施形態では、両方の導入遺伝子（すなわちOX40LおよびCD40L）が前記ウイルスに挿入される。

【0030】

代替的に、OX40LおよびCD40LをコードするDNAは内部リボソーム侵入部位（IRES）の使用などの公知の遺伝子工学技術を使用して、またはより好ましくは、小さいサイズであり、2Aペプチドの上流および下流の遺伝子間で高い切断効率を有するという利点を有する自己切断2Aペプチドの使用を介して、融合分子として結合および挿入され得る。典型的には、CD40LがOX40Lのすぐ下流に挿入されるが、本発明を逆の構成で実施することも可能である。

【0031】

本発明において利用されるウイルスまたはベクターはまた、上記以外の改変を含み得る。任意の追加の構成要素または修正を任意に使用することができるが、本発明にとって必須ではない。

【0032】

続けて、本発明のアデノウイルスまたはベクターは、癌に対する免疫応答を、特に腫瘍環境において刺激するように操作されており、ここで、典型的には、免疫系が癌細胞によって使用される回避メカニズムによって損なわれる。

【0033】

驚くべきことに、我々のデータは免疫刺激遺伝子、ヒトOX40LおよびヒトCD40Lの14.7K座標への追加はバックボーンウイルスAd5/3D24または免疫刺激遺伝子（例えばヒトGM-CSF）を持つウイルスと比較して、本発明のウイルスのがん効能を損なうものではないことを示している。これは削除されたgp19K/7.1K遺伝子に代わるものである。導入遺伝子のサイズおよび感染した細胞に対する導入遺伝子の直接的な影響により、導入遺伝子がウイルス複製に深刻な影響を与える可能性があるため、これは驚くべきことある。さらに、14.7K遺伝子の削除は、gp19K/7.1K遺伝子の削除ほど広範に研究されていないため、特に14.7K削除サイトに遺伝子を組み込む場合、ウイルスの複製機械に予期せぬ結果をもたらす可能性がある。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 3 4 】

また、本発明のウイルスは、14.7 K 遺伝子軌跡から機能的ヒト導入遺伝子を産生できることも示している。やや通常とは異なり、2つの導入遺伝子の間にウイルスの2Aプロセシング部位をもつ転写カセットを用いたため、これは予想外であった。

## 【 0 0 3 5 】

さらに、本発明者らは、本発明のウイルスがMAGE-A3およびNY-ESO-1特異的免疫応答を誘発することができることも実証した。

## 【 0 0 3 6 】

従って、本発明は、少なくとも1つの本発明の改変されたアデノウイルスまたはベクターおよび適切な担体を含む医薬組成物にも関する。本発明の好ましい実施形態では、前記医薬組成物が腫瘍内、筋肉内、動脈内、静脈内、胸膜内、小胞内、腔内もしくは腹腔内注射、または経口投与のために製剤化される。

10

## 【 0 0 3 7 】

従って、さらなる態様において、本発明は、個体に、本発明による少なくとも1つのアデノウイルスまたはベクターを含む有効量の医薬組成物を投与することを含む、個体における癌を治療する方法に関する。

## 【 0 0 3 8 】

それ加えて、または代替的に、本発明は、癌を治療するために使用するための、本発明による少なくとも1つのアデノウイルスまたはベクターまたは組成物に関する。

## 【 0 0 3 9 】

さらに、または代替的に、本発明は、癌を治療するための、本発明による少なくとも1つのアデノウイルスまたはベクターまたは組成物の使用に関する。

20

## 【 0 0 4 0 】

さらに、または代替的に、本発明は、癌を治療するための医薬の製造における、本発明による少なくとも1つのアデノウイルスまたはベクターの使用に関する。

## 【 0 0 4 1 】

腫瘍が身体の免疫細胞を打ち消すためのいくつかの免疫抑制メカニズムを進化させた場合、本発明の治療はまた、チェックポイント分子の使用と組み合わせて実施される。最もよく特徴づけられているチェックポイント経路は、細胞傷害性Tリンパ球蛋白質4 (CTLA-4) およびプログラム細胞死蛋白質1経路 (PD-1/PD-L1) である。従って、本発明のアデノウイルスまたはベクターは、免疫抑制腫瘍環境を阻害し、そして強力な抗免疫応答を引き起こすために、抗PD1、抗PD-L1または抗CTLA-4分子のようなチェックポイントモジュレーターと組み合わせて使用することができる。

30

## 【 0 0 4 2 】

修飾されたアデノウイルスまたはベクターは、標的ペプチドに対する最適な免疫応答に必要な危険シグナルを提供するが、複製アデノウイルスまたはベクターの場合にはそれが感染してそのゲノムをその中で複製する癌細胞を溶解するその能力を保持するため、活性アジュバントとして作用する。腫瘍溶解細胞殺傷は本質的に免疫原性であり、ペプチド/腫瘍に対する免疫応答を強化する可能性がある腫瘍微小環境の変化を引き起こす。従って、長いペプチド (poly-リジン尾部を有さない20アミノ酸) と物理的に複合体化されたペプチドである本発明の修飾アデノウイルスを使用することで、ペプチドワクチンまたは腫瘍溶解ワクチン単独のいずれかと比較した場合、優れた抗腫瘍免疫応答を生じる。

40

## 【 0 0 4 3 】

最も好ましくは、本明細書における癌は、以下の癌のいずれか1つ以上を含む：鼻咽頭がん、滑膜がん、肝細胞がん、腎がん、結合組織がん、黒色腫、肺がん、腸がん、結腸がん、直腸がん、結腸直腸がん、脳がん、喉がん、口腔がん、肝がん、骨がん、膵臓癌、絨毛癌、ガストリノーマ、フェオクロモサイトーマ、プロラクチノーマ、T細胞白血病/リンパ腫、神経腫、フォン・ヒッペル・リндаウ病、ゾリンジャー・エリソン症候群、副腎癌、肛門癌、胆管癌、膀胱癌、尿管癌、乏突起膠腫、神経芽細胞腫、髄膜腫、脊髄腫瘍、骨癌、骨軟骨腫、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、原発部位不明の癌、カルシノイド、胃腸管の

50

癌腫、線維肉腫、乳癌、パジェット病、頸部癌、食道癌、胆嚢癌、頭部癌、眼がん、頸がん、腎臓がん、ウィルムス腫瘍、肝がん、カボシ肉腫、前立腺がん、精巣がん、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、皮膚がん、中皮腫、多発性骨髄腫、卵巣がん、内分泌腺がん、グルカゴノーマ、副甲状腺がん、陰茎がん、下垂体がん、軟組織肉腫、網膜芽細胞腫、小腸がん、胃がん、胸腺がん、甲状腺がん、栄養芽細胞がん (trophoblastic cancer)、胞状奇胎 (hydatidiform mole)、子宮がん、子宮内膜がん、膣がん、外陰がん、聴神経腫、真菌性真菌症、インスリン腫、カルチノイド症候群、体細胞スタチン腫、歯肉がん、心臓がん、唇がん、髄膜がん、口腔がん、神経がん、口蓋がん、耳下腺がん、腹膜がん、咽頭がん、胸膜がん、唾液腺がん、舌がん、扁桃がん。

10

## 【0044】

本願の特許請求の範囲および本発明の前述の説明において、文脈が明示的な言葉または必要な含意のために別途必要とする場合を除いて、単語「含む (comprises)」または「含む (comprises)」もしくは「含む (comprising)」などの変形は包括的な意味で使用される、すなわち、記載された特徴の存在を指定するが、本発明の様々な実施形態におけるさらなる特徴の存在または追加を排除するものではない。

## 【0045】

本明細書に引用された、任意の特許または特許出願を含む全ての参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる。いかなる参考文献も先行技術を構成することは許可されない。さらに、先行技術のいずれも、当該技術分野における一般的な知識の一部を構成することを認めるものではない。

20

## 【0046】

本発明の各態様の好ましい特徴は、他の態様のいずれかに関連して記載されるとおりであり得る。

## 【0047】

本発明の他の特徴は、以下の実施例から明らかになるのであろう。一般的に、本発明は、本明細書 (添付の特許請求の範囲および図面を含む) に開示された特徴の任意の新規なもの、または任意の新規な組み合わせに及ぶ。したがって、本発明の特定の態様、実施形態または例に関連して記載される特徴、整数、特性、化合物または化学部分は、本明細書に記載される任意の他の態様、実施形態または例に適合しない限り適用可能であると理解されるべきである。

30

## 【0048】

さらに、特に断らない限り、本明細書に開示される任意の特徴は、同じまたは同様の目的を果たす代替の特徴によって置き換えられてもよい。

## 【0049】

本明細書の記載および特許請求の範囲を通して、単数形はその状況が他のことを要求していない限り、複数形を含む。特に、不定冠詞が使用される場合は本明細書がその状況が他のことを要求していない限り、単数だけでなく複数も意図していると理解されたい。

## 【実施例】

## 【0050】

本発明の実施形態は、以下の実施例を参照して説明される。

40

## 【0051】

図1は、本発明による修飾アデノウイルスの概略図を示す。具体的には、Ad5アデノウイルスが血清型3ノブタンパク質を含むように改変される。Ad3ノブおよび、理想的には本発明の2つまたは3つのポリペプチドがポリリジン尾部の使用を介して、ウイルスのカプシドに付着され、これらのポリペプチドはウイルスゲノムの一部を形成しないが、カプシドに共有結合または非共有結合で付着される。本明細書ではPeptiCRAd-1と称するが、このイノベーションはしたがって、癌を攻撃するために、免疫系のすべての主要なアームを利用する。

## 【0052】

50

図2は、選択された2つのペプチドを示す。それらはMHCクラスI分子に直接結合するのではなく、提示されるためにAPCによる抗原プロセッシングを必要とする。したがって、ペプチドは非プロフェッショナルAPC上のMHCクラスI分子に結合できず、一過性の活性化とそれに続くCD8+T細胞のアネルギーを引き起こさない。活性化されたプロフェッショナルAPC（さらなる修飾されたアデノウイルスに存在する場合、ウイルスコード化CD40Lからさらなる共刺激を受けることができる）のみが、これらのペプチドをT細胞に提示して、ペプチド特異的CD8+T細胞の強固な活性化および増殖を導くことができる（さらなる共刺激および増強された記憶T細胞応答はさらなる修飾されたアデノウイルスに存在する場合、ウイルスコード化OX40Lから提供される）。

【0053】

図3は、図2のペプチドのN末端におけるポリリジン尾部が癌患者において既知の免疫活性化能力を有する臨床的に使用された未修飾ペプチドと比較した場合に、ペプチドの免疫学的特性を変化させないことを示す。

【0054】

図4は、水中のNY-ESO-1ペプチド-ウイルス複合体および異なるペプチド濃度を有する生理的塩の両方の平均流体力学的直径を示す。

【0055】

図5は、NYESO-1およびMAGE-A3-ペプチド被覆修飾ウイルス(OX40L-およびCD40L-発現ウイルス(PeptiCRAd-1)を含む5/3カプシド、またはNYESO-1およびMAGE-A3-ペプチド被覆(VALO-C1)またはペプチドのみを含まない同一ウイルスを含む、本発明によるNYESO-1およびMAGE-A3-ペプチド被覆修飾ウイルスで処理した場合の、処理および対側、未処理の腫瘍におけるT細胞の頻度を示す。CD3+T細胞(A)、CD4+T細胞(B)およびCD8+T細胞(C)の数は、各治療群の腫瘍組織1g当たりの細胞として描出される。処置は、モックと比較して、全ての群においてより高いT細胞頻度をもたらした。最も多かったのはVALO-C1またはPeptiCRAdで治療された腫瘍であった。

【0056】

図6は、ペプチドコーティング(VALO-C1)またはペプチド単独を用いずにPeptiCRAd-1または同じウイルスで処理した場合の、処理した腫瘍および対側の未処理腫瘍におけるすべての免疫細胞(CD45+細胞)の頻度を示す。頻度はすべての群で類似しており、偽処置動物ではいくらか低い数であった。

【0057】

図7は、PeptiCRAdおよびVALO-C1による処理が、処理された腫瘍におけるすべてのTILからの制御性T細胞の割合を減少させることを示す。

【0058】

図8は、ペプチドコーティング(VALO-C1)またはペプチド単独なしでPeptiCRAd-1または同じウイルスで処理した場合の血液腫瘍中のNY-ESO-1(A)およびMAGE-A3特異的(B)CD8+T細胞の割合を示す。パーセンテージは、血液1mlあたりのすべてのCD8+T細胞から算出される。PeptiCRAd処理はNY-ESO-I特異的CD8+T細胞の最高パーセンテージをもたらし、VALO-C1およびPeptiCRAd処理の両方は、模擬またはペプチド処理動物のいずれかと比較した場合、より高いパーセンテージのMAGE-A3特異的をもたらした。

【0059】

図9は、ペプチドコーティング(VALO-C1)またはペプチド単独を用いずにPeptiCRAd-1または同じウイルスで処理した場合、または対側の未処理腫瘍におけるNY-ESO-1またはMAGE-A3特異的CD8+T細胞の割合を示す。パーセンテージは、腫瘍組織1g当たりの全てのCD8+T細胞から算出される。VALO-C1およびPeptiCRAdは、ペプチド特異的CD8+TILを腫瘍に動員するのに同等に有効である。

【0060】

10

20

30

40

50

図10は、NY-ESO-1およびMAGE-A3タンパク質でコーティングされたPeptiCRAdが大きな、十分に確立された腫瘍に対して治療を開始しても、ヒト化マウスメラノーマモデルにおいて腫瘍増殖を停止することができることを示す。実験条件： $2 \times 10^6$ のSK-MEL-2細胞をNOD/Shi-scid/IL-2R<sup>-/-</sup>欠損免疫不全マウスの側面に1日目に皮下(1匹当たり1腫瘍)移植した。13日目に、 $5 \times 10^6$ のPBMCを静脈内注射した。16日目に、 $5 \times 10^4$ 形質細胞様細胞および骨髄性樹状細胞を腫瘍内に注射した。 $1 \times 10^9$ の用量での腫瘍内ペプチドCRAd処置を、16日目、17日目、18日目(初回投与)、および25日目(追加免疫)に与えた。最初のPeptiCRAd投与は、DC注射直後に投与した。腫瘍増殖を追跡した。動物を32日目に殺した。PeptiCRAd = Ad5/3-D24-OX40L-CD40L、E1Aにおける24bp欠損を伴うオンコリチックアデノウイルス、NY-ESO-1およびMAGE-A3ペプチドで被覆した14.7K軌跡から発現した5/3キメラカプシドおよびCD40LおよびOX40Lトランスジェン; OX40L-PeptiCRAd = Ad5/3-D24-OX40L、E1Aにおける24bp欠損を伴うオンコリチックアデノウイルス、14.7K軌跡から発現した5/3キメラカプシドおよびOX40Lトランスジェン、NY-ESO-1およびMAGE-A3ペプチドで被覆した。

#### 【0061】

図11は、模擬処置動物と比較して、OX40L-PeptiCRAdが末梢血中のMAGE-A3特異的CD8<sup>+</sup>T細胞数を増加させたことを示す。PeptiCRAdで処理した2匹の動物は、血液中のMAGE-A3特異的CD8<sup>+</sup>T細胞数の増加も示した。抗MAGE-A3 T細胞は、32日目の前述の腫瘍増殖試験の終了時にフローサイトメトリー(五量体分析)により評価した。

#### 【0062】

図12A)は、滅菌水中に希釈され、流動緩衝液として滅菌水を使用するAPTESセンサ上での固定化したAdV調製中における3つの別々のSPR応答を示す。 $C = \sim 1.93 \times 10^{11}$  VP/ml。B)は、3つの異なるペプチドコーティングの場合のSPR応答である: PEP1455 = KKKKKK-VFGIELMEVDPIGHL YIFAT(配列番号4); PEP1456 = KKKKKKKK-VFGIELMEVDPIGHL YIFAT(配列番号7); PEP1508 = KKKKKK-YLAMPFATPMEAE LARRSLA(配列番号5)。濃度を増加させたストック溶液(滅菌水中5mg/ml)を、固定化AdV粒子と相互作用させた。滅菌水を流動緩衝液として使用した。矢印は対応する濃度でのペプチドサンプル注入の時点を示し、星印は、ランニングバッファーでのフラッシュの開始の時点を示す。図中に記した $max$ と $min$ の値は、それぞれの状態について、ウイルス粒子当たり相互作用するペプチドの数を計算するために使用したSPR応答に対応する(溶液中100 $\mu$ Mに存在するペプチド、 $max$ 、および溶液中にペプチドが存在しない( $min$ ))。

#### 【0063】

図13は、A195緩衝液中で希釈されたペプチドコーティングPEP1455、PEP1456およびPEP1508試料の濃度を増加により固定化AdV粒子と相互作用させた場合のSPR応答である。矢印は対応する濃度を有するペプチドサンプル注入の時点を示し、星印は、流動緩衝液(A195培地)でのフラッシュの開始の時点を示す。図面にマークされた $max$ と $min$ の値は、それぞれの状態(溶液中に100 $\mu$ M存在するペプチド、 $max$ 、および溶液中にペプチドが存在しない、 $min$ )においてウイルス粒子当たり相互作用するペプチドの数を計算するために使用されたSPR応答に対応する。下付き文字「 $min$ 、 $med$ 」および「 $max$ 、 $med$ 」は、対応する測定値から計算された2つの別個の測定値の中央値を指す。

#### 【0064】

<方法及び材料>

ペプチド:

ペプチドは、ヒト患者に適した塩形態である酢酸対イオンを用いて選択した。ペプチド

は、PepScanによって製造されたものである。

【0065】

PeptiCRAdにおける臨床使用を意図した特定のペプチドは、以下のものである：

- MAGEA3タンパク質（アミノ酸161～180、配列KKKKKK（KKK）-VFGIELMEVDPIGHLYIFAT）、6（配列番号4）または9（配列番号7）のいずれかのアミノ末端から延びるリジン尾部を有する20量体ペプチド；

- NY-ESO-1タンパク質（アミノ酸91～110、配列KKKKKK（KKK）-YLAMPFATPMEAE LARRSLA）、6（配列番号5）または9（配列番号8）アミノ末端から延びるリジン尾部を有する20量体ペプチド；

- NY-ESO-1タンパク質（アミノ酸81～100、配列KKKKKK（KKK）-RGPESRLLEFY LAMPFATPM）、6（配列番号6）または9（配列番号9）アミノ末端から延びるリジン尾部を有する20量体ペプチド。

10

【0066】

PeptiCRAd製剤に使用されるアデノウイルス：

アデノウイルス 24、血清型3アデノウイルス（AdV 5/3）由来の改変ノブを有する血清型5ウイルス。このモデルウイルスは正確には臨床使用を意図したウイルスではないが、同一のウイルスのカプシドを有している。モデルウイルスと臨床ウイルスの違いは、臨床ウイルスが理想的にはCD40LおよびOX40Lをコードする遺伝的挿入物を含む点である。これらの挿入物がウイルスのカプシドおよび本明細書で研究した特性に寄与しない。

20

【0067】

PeptiCRAd複合体形成：

個々のペプチドを水または0.5%生理食塩水で希釈して、5 ug/μlのペプチドストック濃度に到達させた。A195緩衝液（1,45E+12 VP/ml）中のウイルスストックを水中で希釈して、1E+9 VP/μlの濃度に到達させた。ウイルス-ペプチド複合体を、1または3 μlのウイルス希釈液（1E+9または3E+9 VPに等しい）を可変容量のペプチドと混合して、標的ペプチド対ウイルス比に到達させることによって調製した。

【0068】

（PeptiCRAd、個々のペプチド）；ウイルスの2つの個々のアリコット（aliquots）を、単一のペプチドで別々にコーティングした。次いで、これらの2つの別々の単一ペプチドで被覆したペプチドPeptiCRAd（NY-ESO-1複合体およびMAGE-A3複合体）を、腫瘍注射の直前に混合した。別々にコーティングされたウイルスを別々の注射として与えることもできる。あるいは、NY-ESO-1およびMAGE-A3ペプチドを最初に混合し、次いで、このペプチド混合物をPeptiCRAd複合体形成のために使用する。

30

【0069】

複素サイズと電荷のゼータサイザー測定：

ゼータサイザー（zetalyzer）測定は、複合体形成直後、成分を混合した15分後、または複合体を室温（RT）で約1.5時間静置した後に行った。ウイルス-ペプチド複合体を、まず、700 μlの水をサンプルに添加することによって希釈し、次いで、測定キュベットに移した。流体力学的直径（nm）を測定し、続いてゼータ電位（mV）を測定した。これらのパラメーターを3回測定し、平均サイズおよびゼータ電位を記録した。

40

【0070】

PeptiCRAd-1ペプチドの免疫学的効力：

既知のNY-ESO-1およびMAGE-A3 T細胞活性を有する黒色腫患者由来のCD8+T細胞を、未修飾ペプチド（配列番号2：NY-ESO-1 91-110：YLAMPFATPMEAE LARRSLA、または配列番号1：MAGE-A3 161-180：VFGIELMEVDPIGHLYIFAT）で前刺激した。ポリ リジン拡張ペプチ

50

ド(配列番号5: NY - ESO - 191 - 110: KKKKKKYLAMPFATPMEAELARRSLA、または配列番号4: MAGE - A3 161 - 180: KKKKKKVFGEIELMEVDPIGHLYIFAT)の認識を標準IFN - ガンマELISPOT法によって実験した。以下のELISPOTプロトコールを実験に使用した: MACS (登録商標)細胞分離カラム(Miltenyi Biotech、Lund、Sweden)で精製したCD4 + / CD8 + T細胞を、CD4 + およびCD8 + T細胞を枯渇させたペプチドパルス(10 µg / ml)照射自己PBMC(25000細胞/ウェル)で予備感作した。前感作CD4 + / CD8 + T細胞を、ペプチドパルス(1 µg / ml)自己抗原提示細胞(EBV形質転換B細胞またはDC)の認識のために、IFN ELISPOTアッセイにおいて10 ~ 12日に試験した。16時間のインキュベーション(37 )後、

10

【0071】

インビボ免疫化

NOD/Shi scid/IL 2R null免疫不全マウスを、ヒト臍帯血から単離した造血幹細胞(CD34 + , HLA B35 + )を用いてヒト化した。A375ヒト黒色腫瘍を皮下に移植し(100 ul当たり $2 \times 10^6$ 細胞)、動物をヒト化速度および腫瘍の大きさに基づいて群に無作為化した。動物を、ペプチドコーティングなしのPeptiCRAd - 1または同じウイルス(VALO - C1)(両方の群についてウイルス用量 $1 \times 10^8$ ;  $1 \times 10^7$ の準最適用量もまた、PeptiCRAdについて試験した)のいずれかで処置した。ペプチドワクチン(0.12または30 ug)をアジュバントとしてPoly - ICを皮内投与した。

20

【0072】

処理は、シクロホスファミドのボラス投与(1mg / マウスi.v.)による無作為化(D0)の25日後に開始した。治療は、1、2、3および12日目に腫瘍内(模擬、ウイルスおよびPeptiCRAd)または皮内(ペプチド対照)に行った。二次腫瘍は、3回目の治療(5日目)の2日後に対側側腹部に移植した。二次性腫瘍に対する治療は行われなかった。

【0073】

末梢血単核細胞(PBMC)および腫瘍浸潤CD8 + リンパ球(TIL)を、NY - ESO - 1: YLAMPFATPMEAELARRSLA(配列番号2)およびMAGE - A3: VFGEIELMEVDPIGHLYIFAT(配列番号1)特異的CD8 + T細胞について、デキストラマー分析を用いたフローサイトメトリーによって分析した。PBMCとTILの間の異なる免疫細胞サブセットを評価した。フローサイトメトリー分析は、Attune NxT Flow Cytometer(Life Technologies)で行った。

30

【0074】

PBMCマウスモデル免疫化

35匹の8週齢のNOD - Prkdcem26Cd52 / IL - 2R 26emCd22 / Njucrl免疫不全マウス(NCG)に、 $2.10^6$ のSKMEL - 2腫瘍細胞(HLA - B35 + )を右側腹部に移植した(0日目)。13日目に、2人の異なったドナーからの $5 \times 10^6$ のHLA - B35 + ヒト末梢血単核細胞を静脈内注射した。NYESO - 1(配列番号2)およびMAGE - A3(配列番号1) - 複合体化5 / 3カプシドを含み、OX40L発現ウイルス(「OX40L PeptiCRAd」)またはNYESO - 1(配列番号2)およびMAGE - A3(配列番号1) - 複合体化5 / 3カプシドを含むOX40LおよびCD40L発現ウイルス(「PeptiCRAd」) - での腫瘍内処置を、それぞれのペプチドと複合体化した $1 \times 10^9$  VPのウイルス投与量で16日目に開始した。最初のPeptiCRAd処理と同時に、50000自家形質細胞様および骨髄系樹状細胞を腫瘍内に注入した。17日目、18日目(初回治療でプライム)および25

40

50

日目（ブースト）に、腫瘍内 P e p t i C R A d 注射により、樹状細胞の添加なしに腫瘍を処置した。治療スキーマを図 10 に示す。腫瘍の増殖を追跡した。動物を 32 日目に殺した。O X 4 0 L - P e p t i C R a d と P e p t i C R A d は、14.7 K 軌跡と 5 / 3 キメリック繊維から表現されるヒト O X 4 0 L トランスジーンである削除 g p 1 9 k / 7 . 1 K 領域、E 1 A に 2 4 b p の削除を含んでいる。

【0075】

ウイルス - ペプチド複合体形成

ウイルス粒子の固定化およびペプチドコーティングと A P T E S 官能化シリカセンサー表面上に固定化されたウイルス粒子との間の相互作用を、2 チャネルポリジメチルシロキサン ( P D M S ) フローチャネルおよび 96 ウェルプレートオートサンプラーアセンブリ ( M P - S P R 2 2 0 A ) を装備したマルチパラメトリック表面プラズモン共鳴 ( S P R ) 装置を用いて測定した。ペプチド被覆は、P E P 1 4 5 5 = K K K K K K - V F G I E L M E V D P I G H L Y I F A T (配列番号 4); P E P 1 4 5 6 = K K K K K K K K K K - V F G I E L M E V D P I G H L Y I F A T (配列番号 7); P E P 1 5 0 8 = K K K K K K - Y L A M P F A T P M E A E L A R R S L A (配列番号 5) であった。すべての S P R 測定に使用した温度、流速およびレーザー波長は、それぞれ + 2 0 、 2 0 μ l / 分および 6 8 0 n m であった。

10

【0076】

水中での測定では、滅菌水中で希釈された 5 / 3 キメラ繊維 ( ~ 1 . 9 3 × 1 0 <sup>11</sup> V P / m l ) を有するアデノウイルスを A P T E S センサ上に 12 分間固定化し、それぞれの試料について 3 回の測定を行った。滅菌水を流動緩衝液としても使用した。A 1 9 5 緩衝液中での測定のために、アデノウイルスを最初に P B S 中で希釈し、A P T E S センサ上に 12 分間固定した。固定化後、P B S を泳動緩衝液として A 1 9 5 に置き換え、測定を 3 回行った。

20

【0077】

滅菌水中での測定では、ペプチドストック溶液を、5 m g のペプチドを 1 m l の水 ( 5 m g / m l ) に溶解することによって調製し、6 K - M A G E - A 3 ( P E P 1 4 5 5 ) については 1 . 6 5 m M、9 K - M A G E - A 3 ( P E P 1 4 5 6 ) については 1 . 4 6 m M、および 6 K - N Y - E S O ( P E P 1 5 0 8 ) については 1 . 6 6 m M の対応する濃度を得た。ペプチド試料は、各試料濃度間の泳動緩衝液を用いて、6 分間、増加する濃度で連続的に注入され、続いて、8 分間のフラッシュ期間が行われた。使用したペプチド濃度は、0 . 1、0 . 3、1、3、10、30 および 100 μ M であった。

30

【0078】

A 1 9 5 緩衝液中での測定のために、340 μ g の対応するペプチドを A 1 9 5 培地に溶解して 100 μ M 試料溶液を形成することによってペプチドストック溶液を調製し、次いで、より低い濃度を有するペプチド試料溶液を調製するためのストックとして使用した。ペプチドサンプルを、漸増する濃度で 10 分間連続的に注入し、続いて、各サンプル濃度のためにランニング緩衝液を用いて 15 分間フラッシングした。使用したペプチド濃度は、3 . 1 2 5、6 . 2 5、1 2 . 5、2 5、5 0 および 100 μ M であった。

【0079】

ウイルス粒子当たり結合したペプチドの数を推定するための計算は、S P R センサ表面上に固定化されたウイルス粒子の推定数および S P R 測定によって決定された吸着ペプチドの最大数の幾何学的計算を利用することに基づいた。

40

【0080】

< 結果と考察 >

複合体形成に対するペプチドの正味電荷の効果

M A G E - A 3 ペプチドは、リジン尾部がない状態で - 3、9 の正味電荷を有する。負電荷を与える 3 つの酸性アミノ酸は、アミノ末端 ( アミノ酸 5、8 および 10 ) の近くに位置する。我々はウイルス表面上のペプチドの適切な結合を達成するために、ペプチドの負の正味電荷が、より長い正のリジン尾部 ( 6 個のリジンの代わりに 9 個 ) で補われな

50

ればならないかどうかを調べた。複合体形成および複合体の安定性に対するリジンテール長の効果を、20または40  $\mu\text{g}$  のいずれかのペプチドと複合体化した  $1\text{E} + 9$  ウイルス粒子を含有するペプチド被覆ウイルスサンプルのゼータ電位および平均複合体サイズを決定することによって評価した。ゼータサイザー測定は、複合体形成直後、成分を混合した15分後、および複合体を室温 (RT) で約1.5時間静置した後に行った。結果を表1に示す。

#### 【0081】

サイズおよびゼータ電位の結果はMAGE-A3ペプチドとの複合体がリジン尾部の長さにかかわらず形成されることを示し、これは少なくともペプチド鎖の特定の位置における負に荷電したアミノ酸が複合体形成を損なわないことを示唆する。より長いリジン尾部は、より短いリジン尾部を有する対応するペプチドよりも、約10%大きいサイズおよびわずかに低いゼータ電位を有する複合体を与えた。新たに調製したサンプルの複合体のサイズに基づいて、そしてサンプルを室温で1.5時間保持した後、いずれかのリジン尾部との複合体は安定であった。新たに調製された複合体ではサイズは複合体形成に使用されるペプチドの量によって影響されなかったが、1.5時間保持されたサンプルでは結果はわずかにインコヒーレントである。結論として、その後のゼータサイザー実験において、6つのリジンテールペプチドを使用することを決定した。

#### 【0082】

複合体のサイズおよびゼータ電位に対する6K-MAGE-A3-ペプチド対ウイルス比の影響

3E+9ウイルス粒子当たり15、30、45および60  $\mu\text{g}$  のペプチドのペプチド対ウイルス粒子比を調製して、複合体のサイズおよびゼータ電位の決定に基づいて、複合体形成および安定性に対する比率の効果(新しく調製した複合体対室温で2時間保持した複合体)を評価した。

#### 【0083】

表2の結果は試験範囲内のペプチド対ウイルス比が低ければ低いほど複合体のサイズが小さくなる傾向を示し、これは、単一のウイルスから構成されるか、または一对のウイルスから形成される小さな凝集体から構成されるペプチド-ウイルス複合体を生じる最適比が決定され得ることを示唆する。複合体はまた、約+30 mVのゼータ電位で少なくとも2時間、非常に安定であった。

#### 【0084】

表3に示すように、6K-MAGE-A3ペプチドを用いて最適なペプチド対ウイルス比を決定する試みを行った。複合体サイズの結果によりは、 $6.6\text{E} + 4 \sim 3.3\text{E} + 5$  のモル比範囲に等しい、3E+9ウイルス粒子当たり1~5  $\mu\text{g}$  の低い6K-MAGE-A3ペプチドが安定な複合体をもたらすことが示唆された。しかし、より低い比率では、複合体は凝集する傾向がある。

#### 【0085】

6K-MAGE-A3ペプチドによるウイルスコーティングが感染能に及ぼす影響

複合ウイルスの腫瘍細胞への感染能は、PeptiCRAdの作用機序の重要な側面の1つ。それが、ウイルス感染性に対するペプチドコーティングの効果が、異なるペプチド対ウイルス比を有する複合体を調製することによって、および免疫細胞化学アッセイ(ICC)に基づいてA549細胞に対する複合体の感染性を決定することによって評価された理由である。表4の結果から、関連するペプチドとウイルスの比率を約1  $\mu\text{g}$  とすると、ウイルスのみのサンプルの感染性の62%が保持されており、ウイルスコーティングは感染性に劇的な影響を及ぼさないことが示唆された。

#### 【0086】

異なる温度での6K-MAGE-A3-PeptiCRAdの安定性

異なる温度での6K-MAGE-A3-PeptiCRAdの安定性を評価するために、3E+9VP当たり15または30  $\mu\text{g}$  の6K-MAGE-A3ペプチドのいずれかを混合し、異なる条件で試料を保存することによって複合体を調製した。安定性は、室温、

10

20

30

40

50

+ 5、- 20、- 80°Cで18~20時間保存したサンプルからゼータサイザーによって試験した。結果を表5に示す。平均流体力学的直径は165nm~276nmの範囲の異なる温度での貯蔵の間、非常に安定なままであり、これは、試験した任意の温度でかなりの凝集が起こらなかったことを示唆する。ゼータ電位はすべての試料において+30mVのレベルを超えており、良好な安定性を示した。最小の粒サイズは-20°Cでの貯蔵後に達成されたが、+4°Cでの貯蔵も集約を防止するのに有利であると思われた。

#### 【0087】

水中で調製した複合体のサイズおよびゼータ電位に対するウイルス比に対する6K NY ESO 1 ペプチド(p81 100)の効果

別の臨床的に興味深いペプチドであるNY-ESO-1-ペプチドを、ゼータサイザー測定によって決定される複合体形成属性、サイズおよびゼータ電位に関して研究した。結果を表6aに示す。複合体のサイズに関して、この特定のペプチドは正弦波様曲線に従うよい、小さなペプチドにおけるより小さな複合体サイズから開始し、1μgのペプチドで局所最大に達するように複合体サイズがより大きくなり、その後、複合体サイズが最小180nmに達する60μgまで複合体サイズが減少し始めるにつれて、複合体サイズの増加に続いた。複合体の安定性に関して、ゼータ電位の結果は、6K-MAGE-A3と比較して、より高いペプチド対ウイルス比が好ましいことを示唆する。NY-ESO-1ペプチドは、アミノ末端に近い2つの負および2つの正のアミノ酸(ペプチド配列の4位および9位の酸性アミノ酸および1位および6位の塩基性アミノ酸)を有する-1の天然電荷を有する。NY-ESO-1の残りの配列はMAGE-A3-ペプチドの場合と同様に、全く疎水性である。

#### 【0088】

水中で調製した複合体のサイズおよびゼータ電位に対するウイルス比に対する6K NY ESO 1 ペプチド(p91 110)の効果

6K NY ESO 1 ペプチド(p91 110)についても、ゼータサイザー測定により決定した複合体形成属性、サイズおよびゼータ電位について実験した。結果を表6bに示す。複合体のサイズに関して、0.5~1μgの範囲のペプチドは適度に凝集した複合体のみをもたらす、このペプチドとの最適比は、3E+9VP当たり1~5μgの間どこかに存在することを示唆する。対応するゼータ電位値はゼロに近いままであり、このことは、複合体の安定性が凝集傾向を伴って最適でないかもしれないことを示唆する。

#### 【0089】

NY-ESO-1ペプチド(p91-110)は、カルボキシ末端に近い2つの負および2つの正のアミノ酸(ペプチド配列の11位および13位の酸性アミノ酸および16位および17位の塩基性アミノ酸)を有する-1の天然電荷を有する。NY-ESO-1の配列の残りは、全く疎水性である。C末端に近い正電荷の位置はまた、ウイルス表面へのC末端の結合を可能にし得る。

#### 【0090】

6K-MAGE-A3-および6K-NY-ESO-1ペプチドの両方でコーティングされたPeptiCRAd

臨床的に興味深いペプチド、NY-ESO-1およびMAGE-A3ペプチドの両方を、ゼータサイザー測定に基づく複合体形成属性に関して混合物として研究した。複合体は、水中および生理学的NaCl(0.9%)中の両方で調製した。結果を表7aおよびbに示す。等量の各ペプチドをウイルスと混合して調製した複合体の平均サイズは、6K-MAGE-A3ペプチド単独で調製した複合体の平均サイズより大きく、6K-NY-ESO-1ペプチド(p81 100)単独で調製した複合体の平均サイズより小さかった。300nm未満の平均サイズは、中程度の凝集のみが複合体形成の間に生じたことを示唆する。複合体は、水中および0.9%NaCl中の両方で、匹敵する複合体サイズで調製することができた。

#### 【0091】

等量の6K-MAGE-A3および6K-NY-ESO-1ペプチド(p91 110)

)をウイルスと混合して調製した複合体の平均サイズは、6 K M A G E A 3および6 K N Y E S O 1ペプチド(p 8 1 1 0 0)から調製した複合体の平均サイズより大きかった。水中では複合体の平均サイズ差は約1.8倍であったが、生理学的NaClでは1.3倍に減少した。400~500nmの平均サイズは、中程度の凝集のみが複合体形成の間に生じたことを示唆する。

#### 【0092】

生理的NaCl中で調製した複合体のサイズおよびゼータ電位に対するNY E S O 1ペプチド対ウイルス比の効果

水中でNY E S O 1ペプチド(p 8 1 1 0 0)と形成された複合体のゼータサイズの結果は、ペプチド濃度の関数としてのサイン様挙動を示唆したので、生理的塩溶液中の複合体形成段階が起こりうる非特異的相互作用を防ぐかどうかを研究した。結果を表8aに示す。結果は、増加するペプチド濃度の関数としての複合体サイズが水中で調製された複合体と全く同様の傾向に従うことを示している。複合体サイズはより大きかったが、いずれにせよ5μgから60μgまでの範囲のペプチド対ウイルス比と全く一致した。結果は、最適なペプチド対ウイルス比が3E+9VP当たり1~5μgの範囲で見出され得ることを示唆する。

10

#### 【0093】

水中でNY - E S O - 1ペプチド(p 9 1 - 1 1 0)と形成された複合体のゼータサイズ平均サイズ結果は1μgより高いペプチド対ウイルス比で凝集が増加し、3000nmより大きい複合体サイズを生じることを示唆した。生理食塩水中の複合体形成段階が凝集を防ぐかどうかを検討した。結果を表8bに示す。増加するペプチド濃度の関数としての複合体サイズが、200~400nmの範囲内で非常に一定であったことを示した。したがって、水中のNY - E S O - 1ペプチド - ウイルス複合体および生理学的塩の両方のデータを提示する図1で示したように、複合体形成の間の液相中の生理学的NaClは、凝集を極めて劇的に防止し得る。3E+9VP当たり1~5μgの関連ペプチド対ウイルス比では、複合体サイズは217~245nm内に留まった。

20

#### 【0094】

PeptiCRAd - 1ペプチドの免疫学的効力

ポリリジン伸長NY - E S O - 1およびMAGE - A 3ペプチドは*in vitro*刺激により、癌患者由来抗原特異的CD8+T細胞におけるIFN- $\gamma$ 産生を、非修飾ペプチドと同程度に効果的に誘発し(図3)、このことは、ポリリジン修飾が機能に影響を及ぼさないことを示している。

30

#### 【0095】

PeptiCRAdはヒト化マウスモデルにおいてペプチド特異的免疫応答を誘発する

全ての活性処理(ペプチド単独、ペプチド被覆を伴わないウイルス[VALO - C 1]、およびNY - E S O - 1およびMAGE - A 3ペプチド被覆を伴うウイルス[PeptiCRAd])は、模擬処理動物と比較して、原発腫瘍における免疫細胞数を増加させた。VALO - C 1およびPeptiCRAd - 1処置動物の両方は処置後にペプチドワクチンまたは模擬処置動物と比較して、原発腫瘍においてより多くのT細胞(CD3、CD4、CD8)を示したが、全体的な浸潤免疫細胞(CD45)の数はすべての群で類似していた(それぞれ、図5および6)。

40

#### 【0096】

さらに、T調節細胞(CD3+/CD4+/FoxP3+)の数は、ペプチドワクチンまたは模擬処置動物由来の原発腫瘍と比較して、VALO - C 1およびPeptiCRAd - 1処置原発腫瘍で少なかった(図7)。このことは、腫瘍内に投与された免疫原性アデノウイルス(裸のウイルスVALO - C 1またはPeptiCRAd - 1のいずれか)が局所の免疫抑制を低下させることによって腫瘍微小環境を調節することを示唆している。

#### 【0097】

VALO - C 1処置動物とは異なり、PeptiCRAd - 1処置動物は処置された原発腫瘍よりも未処置の二次腫瘍においてより多くのCD4+およびCD8+T細胞を示した

50

ことから、ウイルスのペプチドコーティングを介した腫瘍標的化が、遠隔未処置腫瘍における効果の誘導に極めて重要であることが示唆された(表9)。さらに、PeptiCRAd-1処理動物は、プライミング後の血液中のNYESO特異的CD8+T細胞(総CD8+細胞の平均=4.3%)がOV処理動物(平均=0.6%)またはペプチドワクチン処理動物(平均=0.6%)と比較して多かった(図8)。PeptiCRAdおよびVALOC1処理動物におけるMAGE特異的CD8+TILの頻度-処理および未処理腫瘍における-は、ペプチド処理動物におけるMAGE特異的CD8+T細胞の頻度よりも高かった(図9)。興味深いことに、MAGE固有CD8+T細胞の高い頻度はNY-ESO-1-固有CD8+T細胞よりもVALOC1-及びPeptiCRAd処理されたtumorsで見られたが、血中では逆であった。

10

## 【0098】

PeptiCRAdはPBMCマウスモデルにおいてペプチド特異的免疫応答を誘発するNY-ESO-1-およびMAGE-A3-複合体化PeptiCRAdによる治療は、大きな十分に確立された腫瘍に対して治療を開始した場合でも、ヒト化マウスメラノーマモデルにおいて腫瘍増殖停止をもたらした(図10)。OX40L-PeptiCRAdで処理したマウスは、模擬処理マウスよりもPBMCの全CD8+T細胞の中でMAGE-A3特異的CD8+T細胞が有意に多く、PeptiCRAd処理がヒト化マウスにおいてペプチド特異的応答を誘発できることを示した(図11)。

## 【0099】

5/3キメラカプシドを有するアデノウイルスは、最適な複合体形成条件でNY-ESO-IおよびMAGE-A3ペプチドと複合体形成することができる

20

ペプチドコーティングとアデノウイルス粒子(AdV)との間の相互作用を、表面プラズモン共鳴(SPR)技術を用いて研究した。主な目的は、1)NY-ESO-1およびMAGE-A3ペプチドの異なる培地(無菌水およびA195培地、ウイルス調製に一般的に使用される培地)中でのウイルスとの結合力学を決定すること、2)1つのウイルス粒子が各培地中で結合できるペプチド分子の数を推定すること、および3)ペプチド-ウイルス複合体の安定性を評価することであった。ペプチド被覆は、PEP1455=KKKKKKK-VFGIELMEVDPIGHLYIFAT(配列番号4); PEP1456=KKKKKKKKK-VFGIELMEVDPIGHLYIFAT(配列番号7); PEP1508=KKKKKKK-YLAMPFATPMEAELARRSLA(配列番号5)であった。

30

## 【0100】

滅菌水中のAdV粒子に対するSPR反応は0.7°以下であり、これは、検出領域をカバーするウイルスの50%に相当し(1.4°が100%のカバレッジに相当する)(表10)、 $5 \times 10^7$ のウイルス粒子が検出領域内に吸着されると推定される。AdV粒子をA195緩衝液中で流した場合、SPR応答は1.2°以下であり、これは検出表面の86%の被覆率に相当する(図12)。これらの結果は、検知領域内に吸着された $8.6 \times 10^7$ のウイルス粒子の推定値を与える。これらの結果は、ウイルスの構造が無菌水中よりもA195緩衝液中で良好に保存されること、またはA195緩衝液がAPTES表面へのウイルスの吸着を促進することを示すものといえる。

## 【0101】

ペプチド1455および1508は、A195培地よりも無菌水中の固定化ウイルス粒子により良好に吸着する(図12Bおよび13)。反対のことは、固定化されたウイルス粒子上に吸着されるペプチド1456については水中よりもA195緩衝液中で有意に良好に当てはまる。ウイルス当たりに吸着されたペプチドの数を表10に示す。

40

## 【0102】

以上の結果に基づくと、PEP1455はA195緩衝液に完全には溶解せず、PEP1456はA195緩衝液中のペプチド対ウイルス比によって判断されるように、溶解度およびコーティング効率に関して、より潜在的な修飾であると思われる。これらの結果は、ペプチドウイルス複合体が、適切な緩衝環境において5/3キメラカプシドおよび6/9Kペプチドを有するアデノウイルス構築物を使用して調製され得ることを示す。複合体

50

はSPRの結果によって示されるように、遊離ペプチド環境なしで非常に安定である。さらに、ペプチド対ウイルス粒子比はペプチド配列特異的因子であり、複合体形成のための最適条件の存在にも依存する。

【0103】

<まとめ>

3つの試験されたペプチド、1つの6K-MAGE-A3および2つの6K-NY-ESO-1では、複合体サイズはペプチド対ウイルス比に依存し、各ペプチドおよびペプチドおよびウイルスの各組み合わせについて決定されるペプチド特異的特性であると考えられる。6K-NY-ESO-1(p91110)の場合には、水の代わりに生理的塩溶液中で複合体を調製することにより、複合体形成中の凝集および起こりうる非特異的相互作用をある程度防ぐことができる。6K-NY-ESO-1(p81100)ではかかる挙動はないため、ペプチド特異的な挙動であることが示唆された。

10

【0104】

6K-MAGE-A3ペプチドとの複合体形成は関連ペプチド/ウイルス比を用いた場合、62%の感染能が残存し、ウイルスの感染能を有意に悪化させなかった。

【0105】

MAGE-A3複合体安定性に基づいて、複合体の最適な貯蔵状態は+4°Cまたは-20°Cのいずれかであると考えられる。

【0106】

ペプチドコーティングを伴うペプチドCRAdは、全身性腫瘍標的CD8+T細胞応答および未治療の遠隔腫瘍へのCD8+TILの浸潤の誘発において、裸の腫瘍崩壊性アデノウイルス(VALO-C1)または標準的ペプチドワクチン接種よりも優れている。このデータは、PeptiCRAdが標準的な腫瘍崩壊性ウイルスの腫瘍標的特異性を改善することを示唆するものである。

20

30

40

50

【表 1】

表 1 : 1 E + 9 ウイルス粒子と 2 0 または 4 0  $\mu$  g の M A G E - A 3 - ペプチドと 6 または 9 の リジン尾部との割合でウイルスおよびペプチドを混合することによって調製されたペプチド-ウイルス複合体の平均直径およびゼータ電位。

試料	流体力学的直径 (n m)	ゼータ電位 (m V)
A d 5 / 3 + 6 K - M A G E - A 3、2 0 $\mu$ g	181.1	30.3
A d 5 / 3 + 6 K - M A G E - A 3、4 0 $\mu$ g	178.9	34.2
A d 5 / 3 + 6 K - M A G E - A 3、2 0 $\mu$ g、1. 5 時間	222.3	28.2
A d 5 / 3 + 6 K - M A G E - A 3、4 0 $\mu$ g、1. 5 時間	185.6	31.1
A d 5 / 3 + 9 K - M A G E - A 3、2 0 $\mu$ g	200.5	20.7
A d 5 / 3 + 9 K - M A G E - A 3、4 0 $\mu$ g	197.4	24.0
A d 5 / 3 + 9 K - M A G E - A 3、2 0 $\mu$ g、1. 5 時間	212.0	28.6
A d 5 / 3 + 9 K - M A G E - A 3、4 0 $\mu$ g、1. 5 時間	310.9	30.4

10

20

30

40

50

## 【表 2】

表 2 : 3E+9 ウイルス粒子を表に示す異なる量の 6K-MAGE-A3 ペプチドと混合することによって、調製直後または調製から 2 時間後に測定したペプチド-ウイルス複合体の平均流体力学的直径およびゼータ電位。

試料	Z-Ave d. (nm)	ZP (mV)
Ad5/3 ウイルスのみ、 15'	125.3	-19.6
Ad5/3 ウイルスのみ、 2時間	179.5	-15.2
Ad5/3 + 15 $\mu$ g 6K -MAGE-A3 15'	143.2	28.2
Ad5/3 + 15 $\mu$ g 6K- MAGE-A3 2時間	160.9	28.4
Ad5/3 + 30 $\mu$ g 6K -MAGE-A3 15'	172.4	31.3
Ad5/3 + 30 $\mu$ g 6K- MAGE-A3 2時間	153.0	31.5
Ad5/3 + 45 $\mu$ g 6K -MAGE-A3 15'	151.9	31.1
Ad5/3 + 45 $\mu$ g 6K- MAGE-A3 2時間	201.6	34.9
Ad5/3 + 60 $\mu$ g 6K -MAGE-A3 15'	165.8	35.2
Ad5/3 + 60 $\mu$ g 6K- MAGE-A3 2時間	207.5	54.1

10

20

30

40

50

## 【表 3】

表 3 : 3E+9 ウイルス粒子を異なる量の 6K-MAGE-A3 ペプチドと混合することによって調製したペプチド-ウイルス複合体の平均流体力学的直径およびゼータ電位の結果。

試料	Z-Ave d. (nm)	ZP (mV)
Ad5/3 ウイルスのみ、水中	125.3	-19.5
Ad5/3 + 0.1 $\mu$ g 6K-MAGE-A3、15'	3078.7	0.4
Ad5/3 + 0.5 $\mu$ g 6K-MAGE-A3、15'	235.8	20.4
Ad5/3 + 0.75 $\mu$ g 6K-MAGE-A3、15'	262.6	20.2
Ad5/3 + 1 $\mu$ g 6K-MAGE-A3、15'	194.2	35.6
Ad5/3 + 5 $\mu$ g 6K-MAGE-A3、15'	186.2	23.4
Ad5/3 + 10 $\mu$ g 6K-MAGE-A3、15'	185.2	27.7
Ad5/3 + 15 $\mu$ g 6K-MAGE-A3、15'	164.6	30.3

10

20

30

## 【表 4】

表 4 : 異なる MAGE-A3 ペプチド対ウイルス (3E+9 v p) 比を用いて調製した PeptiCRAd 複合体の感染性。

試料	感染価 (ICC)
Ad5/3 ウイルスのみ、水中	100 %
+0.1 $\mu$ g 6K-MAGE-A3	65 %
+1 $\mu$ g 6K-MAGE-A3	62 %
+15 $\mu$ g 6K-MAGE-A3	22 %

40

50

## 【表 5】

表 5 : 異なる温度で 18 ~ 20 時間保持した後、 $3 \times 10^9$  ウイルス粒子を  $15 \mu\text{g}$  または  $30 \mu\text{g}$  の 6K-MAGE-A3 ペプチドと混合することによって調製したペプチド-ウイルス複合体の平均流体力学的直径およびゼータ電位の結果。

試料	Z-Ave d. (nm)	ZP (mV)	平均 d. (nm)
Ad5/3 $15 \mu\text{g}$ 6K-MAGE-A3、RT	252.0	33.5	239.4
Ad5/3 $30 \mu\text{g}$ 6K-MAGE-A3、RT	226.8	33.4	
Ad5/3 $15 \mu\text{g}$ 6K-MAGE-A3、 $+4^\circ\text{C}$	179.8	31.5	214.3
Ad5/3 $30 \mu\text{g}$ 6K-MAGE-A3、 $+4^\circ\text{C}$	248.8	32.8	
Ad5/3 $15 \mu\text{g}$ 6K-MAGE-A3、 $-20^\circ\text{C}$	152.6	33.0	165.2
Ad5/3 $30 \mu\text{g}$ 6K-MAGE-A3、 $-20^\circ\text{C}$	177.8	36.0	
Ad5/3 $15 \mu\text{g}$ 6K-MAGE-A3、 $-80^\circ\text{C}$	306.3	32.3	275.9
Ad5/3 $30 \mu\text{g}$ 6K-MAGE-A3、 $-80^\circ\text{C}$	245.5	33.9	

10

20

30

40

50

## 【表 6】

表 6 a : 3E + 9 ウイルス粒子を異なる量の 6K - NY - ESO - 1 ペプチド (p 81 - 100) と混合して調製したペプチド - ウイルス複合体の平均流体力学的直径とゼータ電位。

試料	Z-Ave d. (nm)	ZP (mV)
Ad 5 / 3 ウイルスのみ、水中	132.5	-26.6
+0, 1 $\mu$ g 6K-NY-ESO-1	466.3	-23.4
+1 $\mu$ g 6K-NY-ESO-1	594.9	1.8
+15 $\mu$ g 6K-NY-ESO-1	553.8	20.6
+30 $\mu$ g 6K-NY-ESO-1	265.1	24.9
+60 $\mu$ g 6K-NY-ESO-1	179.6	26.6
+120 $\mu$ g 6K-NY-ESO-1	344.4	31.9

10

20

30

40

50

## 【表 7】

表 6 b : 3E + 9 ウイルス粒子を異なる量の 6K - NY - ESO - 1 ペプチド (p 91 - 110) と混合して調製したペプチド - ウイルス複合体の平均流体力学的直径とゼータ電位。

	Z-Ave d. (nm)	ZP (mV)
A d 5 / 3 ウイルスのみ、 水中	169	-18
+0, 1 $\mu$ g 6K-NY- ESO-1	118	-3
+0. 5 $\mu$ g 6K-NY- ESO-1	205	-1
+1 $\mu$ g 6K-NY-ES O-1	202	0
+5 $\mu$ g 6K-NY-ES O-1	1409	6
+ 15 $\mu$ g 6K-NY- ESO-1	1772	11
+30 $\mu$ g 6K-NY-E SO-1	3167	14
+ 60 $\mu$ g 6K-NY- ESO-1	2449	16
+120 $\mu$ g 6K-NY- ESO-1	2346	18

10

20

30

40

50

## 【表 8】

表 7 a :  $3 \times 10^9$  ウイルス粒子を  $1 \mu\text{g}$  の 6K-NY-ESO-1-ペプチド (p 81-100) および MAGE-A3-ペプチドの両方と水中または生理学的 NaCl (0.9%) 中で混合することによって調製したペプチド-ウイルス複合体の平均流体力学的直径およびゼータ電位。

試料	Z-Ave d. (nm)	ZP (mV)
Ad5/3 ウイルスのみ、水中	132.9	-25.0
Ad5/3 + $1 \mu\text{g}$ 6K-MAGE-A3 + $1 \mu\text{g}$ 6K-NY-ESO-1 水溶液	272.9	10.9
NaCl 中の Ad5/3 ウイルスのみ	115.9	-23.3
NaCl 中の Ad5/3 + $1 \mu\text{g}$ 6K-MAGE-A3 + $1 \mu\text{g}$ 6K-NY-ESO-1	301.3	26.7

10

20

## 【表 9】

表 7 b :  $3 \times 10^9$  ウイルス粒子を  $1 \mu\text{g}$  の 6K-NY-ESO-1-ペプチド (p 91-110) および 6K-MAGE-A3-ペプチドの両方と水中または生理学的 NaCl (0.9%) 中で混合することによって調製したペプチド-ウイルス複合体の平均流体力学的直径およびゼータ電位。

試料	Z-Ave d. (nm)	ZP (mV)
Ad5/3 ウイルスのみ、水中	132.9	-25.0
水中の Ad5/3 + $1 \mu\text{g}$ MAGE-A3 + $1 \mu\text{g}$ NY-ESO-1	487.2	19.7
NaCl 中の Ad5/3 ウイルスのみ	115.9	-23.3
NaCl 中の Ad5/3 + $1 \mu\text{g}$ MAGE-A3 + $1 \mu\text{g}$ NY-ESO-1	383.5	27.2

30

40

50

## 【表 10】

表 8 a : 生理的 NaCl (0.9%) 中で 3E+9 ウイルス粒子を異なる量の 6K-NY-ESO-1 ペプチド (p81-100) と混合して調製したペプチド-ウイルス複合体の平均流体力学的直径とゼータ電位。

試料	Z-Ave d. (nm)	ZP (mV)
Ad5/3ウイルスのみ、水中	198.8	-25.5
NaCl中のAd5/3ウイルスのみ	128.1	-22.2
+ 0, 1 $\mu$ g	132.3	-22.2
+ 1 $\mu$ g	2149.0	0.1
+ 5 $\mu$ g	350.4	16.3
+ 15 $\mu$ g	419.7	22.5
+ 30 $\mu$ g	471.2	23.5
+ 60 $\mu$ g	464.6	26.1
+ 120 $\mu$ g	832.8	29.3

10

20

30

40

50

## 【表 1 1】

表 8 b : 生理的 NaCl (0.9%) 中で  $3 \times 10^9$  ウイルス粒子を異なる量の 6K-NY-ESO-1 ペプチド (p91-110) と混合して調製したペプチド-ウイルス複合体の平均流体力学的直径とゼータ電位。

試料	Z-Ave d. (nm)	ZP (mV)
Ad5 / 3 ウイルスのみ、水中	129.8	-20.9
NaCl 中の Ad5 / 3 ウイルスのみ	203.5	-19.5
+ 0.1 $\mu$ g	211.7	-13.7
+ 1 $\mu$ g	217.2	-2.0
+ 5 $\mu$ g	244.9	1.1
+ 15 $\mu$ g	337.4	5.7
+ 30 $\mu$ g	401.2	4.9
+ 60 $\mu$ g	373.4	4.7
+ 120 $\mu$ g	239.0	4.2

10

20

## 【表 1 2】

表 9 : PeptiCRAd で処理した動物は処理した原発腫瘍よりも未処理の遠隔腫瘍でより多くの CD8+ および CD4+ T 細胞を示したことから、PeptiCRAd 処理は、OV と比較してより効率的な抗原提示およびその後の遠隔腫瘍への T 細胞ホーミングを可能にすることが示唆された。結果は、治療した腫瘍 ± SEM に対する未治療の腫瘍浸潤リンパ球数の比として表される。

30

腫瘍浸潤リンパ球	比 (未処理 : 処理)		
	ペプチドワクチン (0.12+30 $\mu$ g) n=5-6	OV ( $10^8$ VP) n=5	PeptiCRAd ( $10^7 + 10^8$ ) n=17-20
総ヒトリンパ球 (CD45)	1.3 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.5
総ヒト T 細胞 (CD3)	1.4 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.5
CD8+ T 細胞	0.8 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.6
CD4+ T 細胞	0.9 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.5

40

50

【表 13】

表10：ウイルスおよびウイルス-ペプチド複合体のSPR測定に基づく結果。

反応媒体	吸着ウイルスR応答 ( $\Delta^\circ$ )	半径 (nm)	センサー表面のウイルス数	ペプチド	吸着ペプチドR応答 ( $\Delta^\circ$ )	質量/区域ペプチド ( $ng/cm^2$ )	マスクペプチド (ng)	$M_w$ ペプチド ( $g/mol$ )	モルペプチド (mol)	吸着ペプチド数	ペプチド吸着数/ウイルス粒子数
<b>最小</b>											
水	0,7	100	49999841	PEP145 5	0,0674	40,44	0,32	3033,7	1,04 708E -13	6,30549 E+10	1261
水	0,7	100	49999841	PEP145 6	0,029	17,4	0,14	3418,3	3,99 833E -14	2,40779 E+10	482
水	0,7	100	49999841	PEP150 8	0,0184	11,04	0,09	3007,7	2,88 319E -14	1,73626 E+10	347
<b>最大</b>											
水	0,7	100	49999841	PEP145 5	0,1532	91,92	0,72	3033,7	2,38 E-13	1,43324 E+11	2866
水	0,7	100	49999841	PEP145 6	0,1303	78,18	0,61	3418,3	1,79 649E -13	1,08185 E+11	2164
水	0,7	100	49999841	PEP150 8	0,0386	23,16	0,18	3007,7	6,04 844E -14	3,64237 E+10	728

10

20

30

40

50

最小												
A 1 9 5	1,2	100	85714013	PEP 1 4 5 5	0, 0174	10, 44	0, 08	3033, 7	2, 7 0 3 1 3 E - 1 4	1, 6 2 7 8 3 E + 1 0	190	
A 1 9 5	1,2	100	85714013	PEP 1 4 5 6	0, 2762	165, 72	1, 30	3418, 3	3, 8 0 8 0 6 E - 1 3	2, 2 9 3 2 2 E + 1 1	2675	
A 1 9 5	1,2	100	85714013	PEP 1 5 0 8	0, 012	7, 2	0, 06	3007, 7	1, 8 8 0 3 4 E - 1 4	1, 1 3 2 3 4 E + 1 0	132	
最大												
A 1 9 5	1,2	100	85714013	PEP 1 4 5 5	0, 078	46, 8	0, 37	3033, 7	1, 2 1 1 7 5 E - 1 3	72971496170	851	
A 1 9 5	1,2	100	85714013	PEP 1 4 5 6	0, 3712	222, 72	1, 75	3418, 3	5, 1 1 7 8 6 E - 1 3	3, 0 8 1 9 7 E + 1 1	3596	
A 1 9 5	1,2	100	85714013	PEP 1 5 0 8	0, 044	26, 4	0, 21	3007, 7	6, 8 9 4 5 9 E - 1 4	4, 1 5 1 9 2 E + 1 0	484	

10

20

30

40

50

【 図 面 】  
【 図 1 】

アデノウイルス血清型5  
T細胞応答のプライミングおよびブーストに最適  
腫瘍細胞を殺傷するために必要なCD8+T細胞応答を最初に誘発  
腫瘍特異性ウイルスに対する既存の免疫が腫瘍内治療の有効性を増強  
良好な臨床的安全性記録

遺伝子組換え  
増大する腫瘍細胞の形質導入のためのキメラAd5/3カプシド  
腫瘍特異的複製のためのE1A1におけるD24欠失  
免疫原性の増大のためのE3の部分的欠失  
免疫原性の増大のためのE3の部分的欠失  
免疫原性の増大のためのE3の部分的欠失  
免疫原性の増大のためのE3の部分的欠失

導入遺伝子としての2つの共刺激分子  
○ 先天性アーム: CD8+T細胞応答を駆動するためのCD40L  
○ 適応アーム: CD8+T細胞の生存および記憶T細胞の大きなプールの形成を増加させるためのOX40L

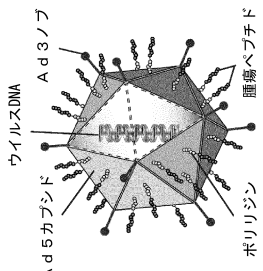


Figure 1

【 図 3 】

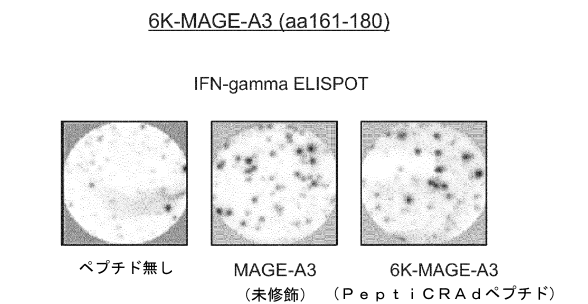
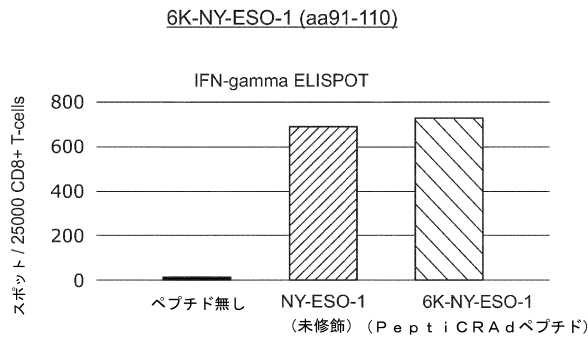


Figure 3

【 図 2 】

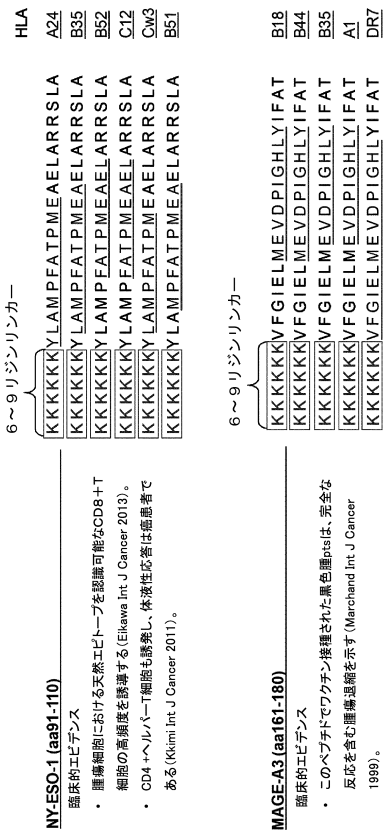


Figure 2

【 図 4 】

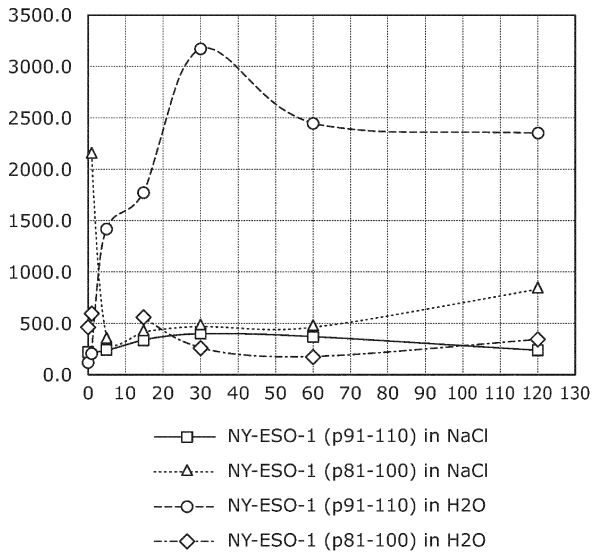


Figure 4

10

20

30

40

50

【図 5 a】

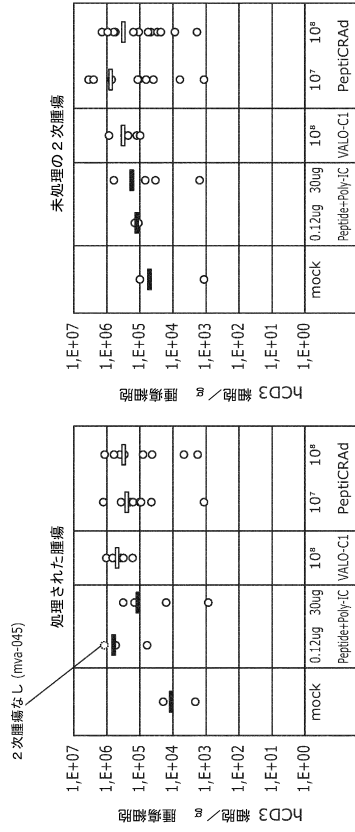


Figure 5a

【図 5 b】

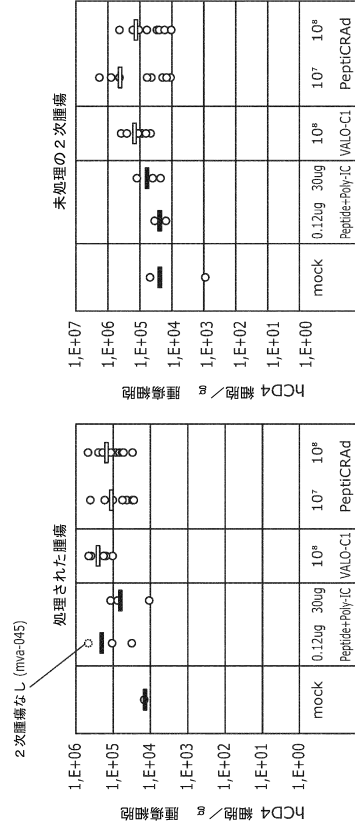


Figure 5b

【図 5 c】

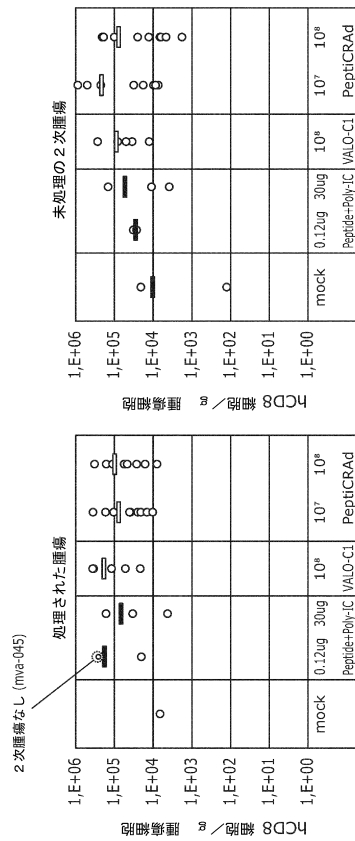


Figure 5c

【図 6】

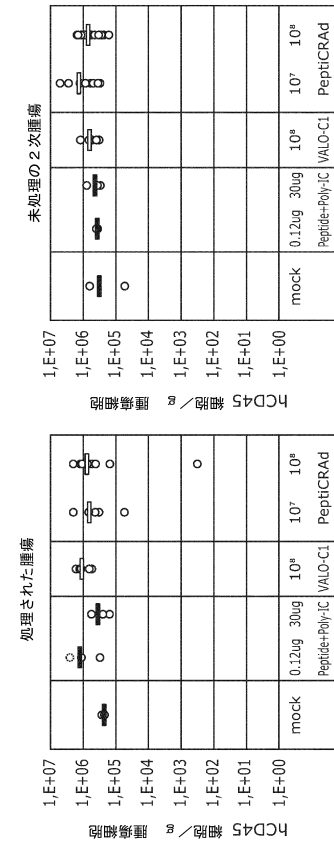


Figure 6

10

20

30

40

50

【図 7】

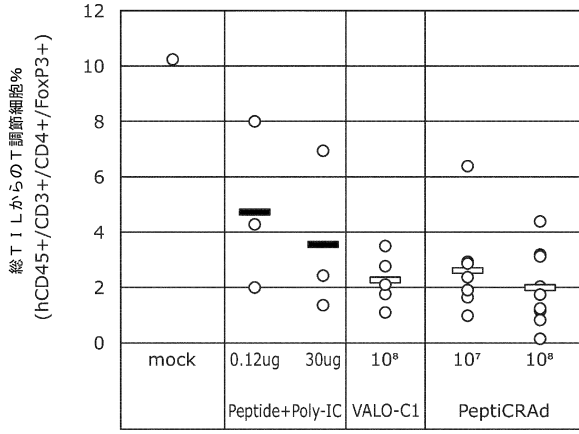


Figure 7

【図 8 a】

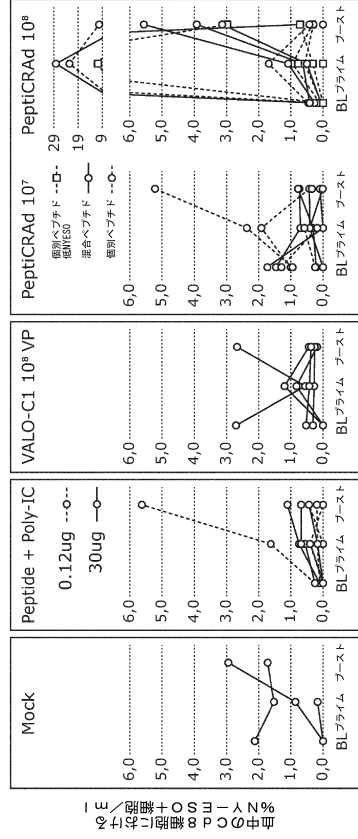


Figure 8a

【図 8 b】

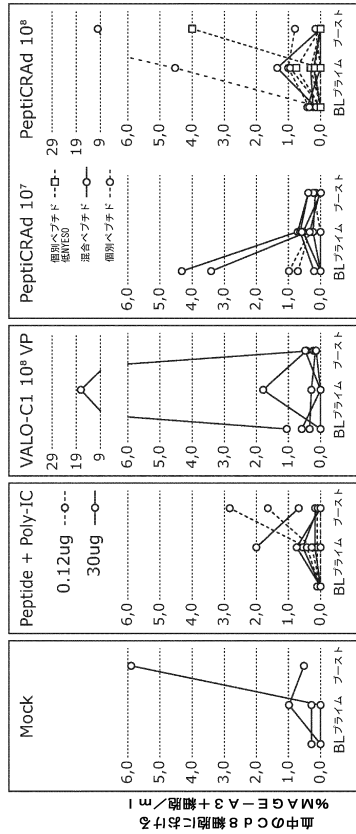


Figure 8b

【図 9】

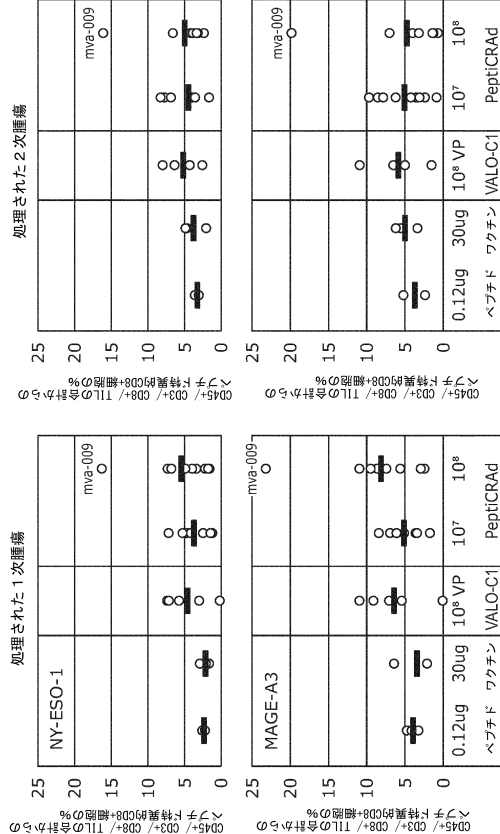


Figure 9

10

20

30

40

50

【図 1 0】

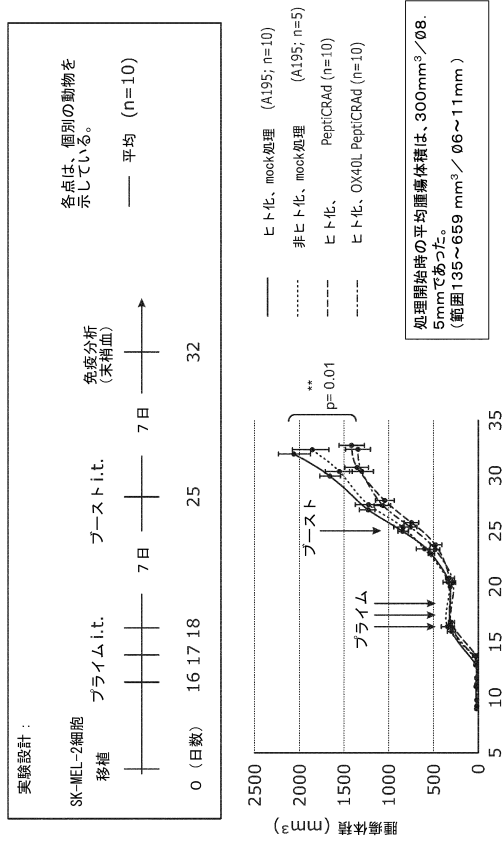


Figure 10

【図 1 1】

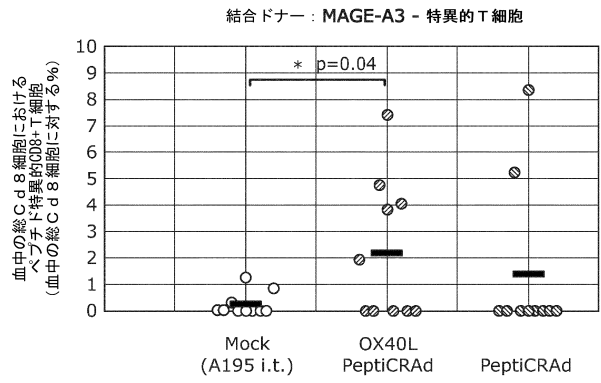


Figure 11

【図 1 2】

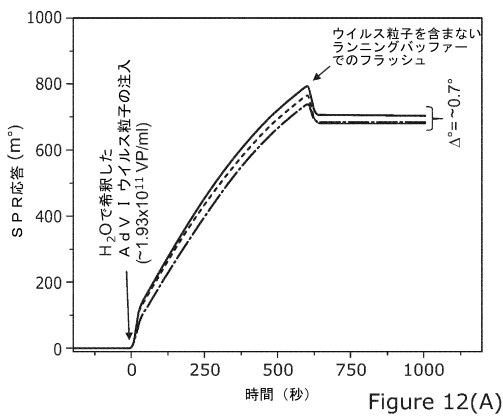


Figure 12(A)

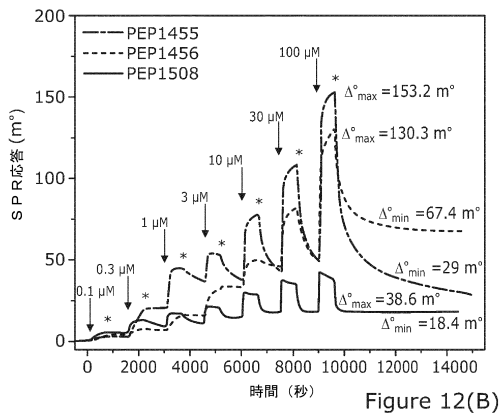


Figure 12(B)

【図 1 3】

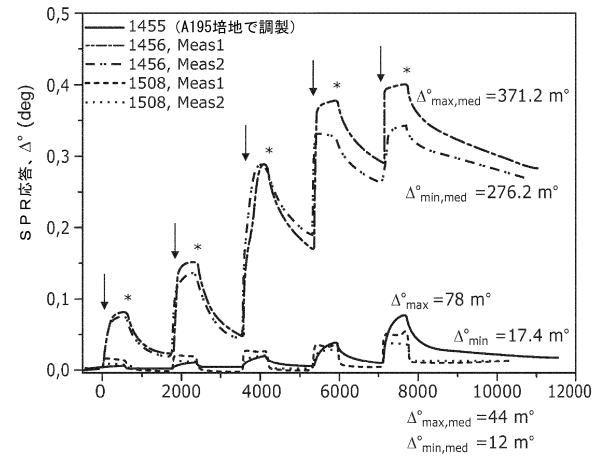


Figure 13

10

20

30

40

50

【配列表】

0007353294000001.app

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

A 6 1 P	35/02 (2006.01)	F I	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	9/08 (2006.01)		A 6 1 K	9/08	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)		A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 K	47/69 (2017.01)		A 6 1 K	47/69	
C 1 2 N	15/861 (2006.01)		C 1 2 N	15/861	Z

## (33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(74)代理人 100143823

弁理士 市川 英彦

(74)代理人 100183519

弁理士 櫻田 芳恵

(74)代理人 100196483

弁理士 川崎 洋祐

(74)代理人 100203035

弁理士 五味淵 琢也

(74)代理人 100160749

弁理士 飯野 陽一

(74)代理人 100160255

弁理士 市川 祐輔

(74)代理人 100202267

弁理士 森山 正浩

(74)代理人 100182132

弁理士 河野 隆

(74)代理人 100146318

弁理士 岩瀬 吉和

(74)代理人 100127812

弁理士 城山 康文

(72)発明者 ランキ, トゥーリ

フィンランド国、0 1 0 0・ヘルシンキ、カンピンクジャ・2、パロ・セラピューティクス・オイ

(72)発明者 ペソネン, サリ

フィンランド国、0 1 0 0・ヘルシンキ、カンピンクジャ・2、パロ・セラピューティクス・オイ

(72)発明者 プリハ, ペトリ

フィンランド国、0 1 0 0・ヘルシンキ、カンピンクジャ・2、パロ・セラピューティクス・オイ

(72)発明者 イレソマキ, エルコ

フィンランド国、0 1 0 0・ヘルシンキ、カンピンクジャ・2、パロ・セラピューティクス・オイ

(72)発明者 セルロ, ビンチェンツォ

フィンランド国、0 1 0 0・ヘルシンキ、カンピンクジャ・2、パロ・セラピューティクス・オイ

(72)発明者 マーティンズ, ベアトリス

フィンランド国、0 1 0 0・ヘルシンキ、カンピンクジャ・2、パロ・セラピューティクス・オイ

審査官 大西 隆史

(56)参考文献 特表2017-522267(JP, A)

特表2007-536326(JP, A)

Kazuhiro Kakimi et al. , A phase I study of vaccination with NY-ESO-1f peptide mixed with Picibanil OK-432 and Montanide ISA-51 in patients with cancers expressing the NY-ESO-1 antigen. , Int. J. Cancer , 2011年12月15日 , Vol.129, No.12 , p.2836-2846 , doi: 10.1002/ijc.25955

Cristian Capasso et al. , Oncolytic adenoviruses coated with MHC-I tumor epitopes increase the antitumor immunity and efficacy against melanoma. , Oncoimmunology , 2015年10月

---

(58)調査した分野 29日, Vol.5, No.4, e1105429, doi: 10.1080/2162402X.2015.1105429  
(Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 7 / 0 0 - 7 / 0 8

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

A 6 1 K 9 / 0 0 - 9 / 7 2

A 6 1 K 4 7 / 0 0 - 4 7 / 6 9

A 6 1 K 3 5 / 0 0 - 5 1 / 1 2

A 6 1 P 1 / 0 0 - 4 3 / 0 0

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )